

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECHNICHE E
ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
SEZIONE DI ISPEZIONE**

TESI DI DOTTORATO IN

**Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale
- XVIII ciclo -**

**CONTROLLI SULLA FILIERA AVICOLA:
TRASPORTO, IGIENE DELLA MACELLAZIONE E
DECONTAMINAZIONE DELLE CARNI TRITE DI
POLLO MEDIANTE ALTE PRESSIONI
IDROSTATICHE**

TUTOR
CANDIDATO

Prof. Adriano Santoro

Dott. Salvatore Ferrante

COORDINATORE
Prof.ssa M.L.Cortesi

ANNI ACCADEMICI 2002- 2005

A mia Sorella Anna

“ Arriverò

fino alla fine del mio sentiero

ci arriverò.

E questa strada sterrata

che mi vede smarrito e

troppe volte impaurito

Percorrerò.

Perché lo so che Tu ci sei e

come un Raggio di Sole riscaldi

i Giorni Miei.

Perché lo so che Tu ci sei e

Ti raggiungerò

Somewhere, Someday”

“La vita può diventare, a volte, come una ballata triste e senza più belle emozioni, ma io penso che il coraggio di cambiarla e, se serve, di stravolgerla per cercare di capire quello che veramente vogliamo, la possano tramutare in una bella nuova canzone che ci può dare ancora tante emozioni” (I. Spagna)

Questo è quello che ho cercato di fare di in questi ultimi anni, dopo che tutto il mio bellissimo mondo è crollato... Il cammino è ancora lungo ma spero di potercela fare.

Il mio primo pensiero va, come sempre, a mia Sorella Anna, che oggi sarebbe orgogliosissima di me e che da lassù mi dà ancora la forza per andare avanti e credere che nulla è vano...Sorella Mi manchi sempre più, giorno dopo giorno, ora dopo ora..Il nostro legame sarà sempre forte perché quando si ama intensamente una persona come io ho amato te è difficile potersene staccare, cancellarne l'immagine e vivere come se non fosse stato mai amore.....We had hope and now it's broken...

Ai miei genitori che nonostante il loro immenso dolore non mi hanno lasciato solo e sanno donarmi ancora un sorriso.. So che nessuno potrà ridarci più quello che abbiamo perso, però spero di potervi dare oggi e in tante altre occasioni, anche se lieve , un po' di felicità e di serenità.. Vi voglio bene

*Al mio piccolo e adorato Principino Luigi, la mia vita, la mia unica
esistenza di vita...Spero di poter essere per te un valido punto di
riferimento. Quell'esempio da poter seguire nel tuo cammino come lo è
stato per me tua madre, il tuo più importante sostegno e darti quella
felicità che meriti ... Ti amo tanto.*

*Un grazie dal profondo del cuore alla Prof.ssa Maria Luisa Cortesi che,
spronandomi sempre, mi ha permesso di amare questa materia, questo
lavoro, e di realizzare un sogno... Grazie per aver avuto fiducia di me e
di essermi stata vicino nei momenti più difficili. Spero di non averla
delusa e di non deluderla.*

*Al mio tutor o meglio ai miei tutor.. Prof. Adriano Santoro e Prof.ssa
Teresa Sarli i miei due angeli custodi. Dirvi grazie sarebbe poco rispetto
a tutto quello che voi avete fatto per me.. Siete stati non solo i miei
maestri di scienza ma anche e soprattutto maestri di vita. Non so come
avrei fatto a continuare senza il vostro sostegno, il vostro
incoraggiamento e il vostro affetto..Siete entrati a far parte della mia
vita in modo improvviso condividendo non solo le mie gioie ma anche il
mio dolore, e ancora oggi siete sempre lì pronti ad aiutarmi e a volermi
bene..Poche sono le persone che hanno un cuore puro, dolce e sensibile
come il vostro e per me non siete solo i miei Prof. ma anche la mia
seconda famiglia perché mi avete trattato come un figlio e so che potrò
sempre contare su di voi.. Un grazie anche a Rosa e Giovanni.. Vi voglio
bene.*

Al prof. EL Hamid Moueffack e a tutto il laboratorio E.R.A.P (Equipe de Recherche Agroalimentaire Périgourdine) I.U.T Périgueux, Université Montesquieu – Bordeaux IV , per avermi accolto amorevolmente permettendomi di trascorrere quattro mesi in assoluta armonia e arricchire le mie conoscenze.

Al dott. Antonio Chianese e alla Dott.ssa. Carmen Antonelli dipendenti ASL NA 3 che con affetto e stima mi hanno aiutato nello svolgimento di questo lavoro .. Grazie.

Alla mia bellissima famiglia Universitaria...Daniela che da più di 5 anni condivide il mio cammino universitario e professionale, sempre pronta ad consigliarmi e aiutarmi. ..Francesca che mi ha aperto la strada per vivere la bellissima esperienza francese...Nicola Grande in tutto, soprattutto per la pazienza a sopportare le mie giornate no..Ester che al momento giusto ha saputo donarmi il suo bellissimo sorriso e la sua tenerezza.... Carmen che con la sua grinta e la sua allegria mi ha spronato sempre a reagire...Alle ultime arrivate Fabiana e Maria Grazia che impareranno a conoscermi meglio... Grazie veramente ragazzi per tutto quello che avete fatto per me in questi anni e per l'aiuto prestato per questo lavoro.....Brontolo vi vuole veramente bene.

A mia cugina Anna, che non mi ha abbandonato un momento, sempre pronta a sostenermi, a darmi coraggio ed ora è diventata la mia migliore Amica e confidente... Ti voglio un Mondo di Bene..

Ai miei migliori Amici: Anna, Francesco e Nicola che mi sono stati vicino più che mai nel momento più duro della mia vita e che pazientemente mi hanno dato la forza per reagire e andare avanti.. Vi voglio bene..E' proprio vero che gli amici si vedono nel momento del bisogno.

Agli Amici Palmesi e Napoletani ..I primi che capito il motivo della mia lontananza non hanno mai smesso di dimostrarmi il loro affetto ... I secondi che senza mai chiedere tante spiegazioni, hanno cercato sempre di farmi capire quanto la vita sia ancora bella da vivere....Grazie ragazzi.

Ed infine un grazie particolare va ad una persona per me molto speciale...ad una persona che è entrata come un fulmine a ciel sereno nel periodo più buio della mia vita e che prendendomi per mano, piano piano mi ha ridato la gioia perduta mettendo a posto tutti i pezzi della mia esistenza e dando loro una coerenza...Di tutto questo te ne sarò per sempre grato anche se non sono riuscito a ricambiare il favore... scusami se ti ho ferito.. Grazie Ma. per amarmi ancora tanto.

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	1
A) <u>ASPETTI IGIENICI-STRUTTURALI</u>	
B) <u>DEGLI IMPIANTI DI MACELLAZIONE</u>	6
 <i>LA MACELLAZIONE DEL POLLAME</i>	12
 MODIFICAZIONI DELLE MICROFLORA DETERIORANTE SULLE CARCASSE LUNGO LA LINEA DI MACELLAZIONE.....	24
C) <u>INFLUENZA DEL METODO</u> DI REFRIGERAZIONE SULLE CONDIZIONI MICROBIOLOGICHE DELLE CARCASSE.....	25
 <i>SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO</i>	26
 1) OSSERVAZIONI SULLE CONDIZIONI DI TRASPORTO DEL POLLAME DESTINATO ALLA MACELLAZIONE.....	27
• <i>MATERIALI E METODI</i>	28
• <i>RISULTATI</i>	30
• <i>CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI</i>	35
 2) MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO DELLE CONDIZIONI DI LAVORAZIONI IN UN MACELLO AVICOLO.....	37
• <i>DECISIONE 2001/471/CE</i>	39
• <i>IL SISTEMA U.S.A.</i>	42
• <i>SCOPO DEL LAVORO</i>	44

• MATERIALI E METODI.....	45
• RISULTATI.....	50
• CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.....	62

3) RAFFRONTO TRA METODO DISTRUTTIVO E NON PER LE ANALISI MICROBIOLOGICHE SU CARCASSE AVICOLE.....	64
--	----

• L'ATTACCAMENTO DI BATTERI SULLA SUPERFICIE DELLA CARNE.....	64
• METODI DI CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DELLA SUPERFICIE DI CARCASSE.....	65
• SCOPO DEL LAVORO.....	68
• MATERIALI E METODI.....	69
• RISULTATI.....	71
• CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.....	80

4) INATTIVAZIONE DI LISTERIA INNOCUA I N TRIPTIC SOY BROTH E CARNI MACINATE DI POLLAME MEDIANTE LE ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE.....	82
---	----

• ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE.....	84
• ALTE PRESSIONI-Principi generali.....	88
• Azione della pressione sulle molecole organiche e reazioni chimiche.....	89
• Azione della pressione sulla componente acquosa degli alimenti.....	94
• Meccanismi d'azione delle Alte Pressioni sulle cellule microbiche.....	96
• Cinetica delle Alte Pressioni.....	98
• Fattori influenzanti l'inattivazione microbica da Alte Pressioni.....	99

- Differenze nella resistenza microbica
alle Alte Pressioni Idrostatiche.....102
- Resistenza microbica alle Alte Pressioni
e composizione chimica dell'alimento.....105
- Sensibilità alle Alte Pressioni
dei microrganismi presenti nella carne.....108
- Azione della pressione
sui microrganismi sporigeni.....109
- Alte pressioni associate ad altri processi
fisici di conservazione degli alimenti.....112
- Azione antimicrobica delle Alte Pressioni
in diversi alimenti.....116
- Congelamento e Scongelo da Alte Pressioni...117
- Prospettive d'impiego delle Alte Pressioni.....118
- SCOPO DEL LAVORO.....122
- MATERIALI E METODI.....123
- RISULTATI.....127
- CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.....136

D) BIBLIOGRAFIA.....137

INTRODUZIONE

L'allevamento avicolo nazionale ha conosciuto, negli ultimi anni, un costante sviluppo, favorito dal ciclo biologico breve, da nuove linee genetiche, dalla disponibilità di mangimi (composti ed integrati), dalle attrezzature razionali, dai controlli sanitari e dalla profilassi vaccinale che hanno consentito il raggiungimento di produzioni elevate, qualificate e ottimali .

A fronte di questo incremento produttivo, si è assistito ad un grosso accentramento delle macellazione in impianti di grandi dimensioni.

L'Istituto nazionale di statistica, a partire da gennaio 2002, effettua mensilmente una rilevazione degli animali quali volatili da cortile, selvaggina da penna e conigli macellati sul territorio nazionale.

Da tali dati si evince che la maggiore concentrazione di stabilimenti per la macellazione delle carni bianche è nel Centro-Nord con 154 mattatoi, il 72,3% del totale, collocati per lo più in Veneto (33 stabilimenti), Lombardia (29), Piemonte (28) ed Emilia-Romagna (27). Nel Mezzogiorno è la Sardegna ad avere il primato della presenza di impianti di macellazione con 19 unità, seguita dalla Campania con 13 e dall'Abruzzo con 9 impianti. (Tavola 1).

Tavola 1 - Impianti di macellazione attivi o temporaneamente inattivi per ripartizione geografica, tipologia e regione al 31/12/2004

REGIONI RIPARTIZIONI GEOGRAFICHE	Stabilimenti attivi o temporaneamente inattivi		TOTALE
	Bollo CEE	Capacità limitata	
Piemonte	24	4	28
Valle d'Aosta	-	-	-
Lombardia	28	3	29
Liguria	-	-	-
Italia nord-occidentale	50	7	57
Trentino-A.A.	2	-	2
Veneto	33	-	33
Friuli V. G.	-	-	-
E. Romagna	28	1	27
Italia nord-orientale	61	1	62
Toscana	9	5	14
Umbria	4	-	4
Marche	12	1	13
Lazio	3	1	4
Italia centrale	28	7	35
Abruzzo	8	1	9
Molise	1	-	1
Campania	13	-	13
Puglia	8	-	8
Basilicata	2	-	2
Calabria	3	1	4
Italia meridionale	33	2	35
Sicilia	5	-	5
Sardegna	14	5	19
Italia insulare	19	5	24
ITALIA	191	22	213

Altro dato significativo, con riferimento alle carni fresche o refrigerate di pollame domestico (ad esclusione di tacchini, anatre e faraone), è costituito dalle 11.753 tonnellate esportate, di cui 10.990 verso l'UE.

A tale quantità si aggiunge l'esportazione di 9.981 tonnellate di carni congelate della stessa specie.

L'eccessiva promiscuità, l'elevato numero degli animali allevati in aree ristrette, l'impegno di mangimi prodotti industrialmente, hanno favorito la distribuzione incontrollata di microrganismi saprofiti, opportunisti e soprattutto potenziali patogeni all'interno degli allevamenti, degli impianti di macellazione e di conservazione.

Le carni avicole ospitano una ricca flora microbica autoctona o proveniente dalle feci, dai mangimi, dall'acqua o dall'aria degli ambienti con cui vengono a contatto (allevamenti, macelli, attrezzature).

I microrganismi si localizzano sulla superficie esterna (zampe, penne, piume, pelle) nelle vie digerenti e respiratorie.

Inizialmente sul volatile vivo la flora microbica è costituita da batteri Gram positivi di origine ambientali (allevamenti, macelli), dopo la macellazione diviene prevalentemente Gram negativa di origine sia ambientale sia fecale.

Tuttavia germi Gram positivi quali la *Listeria* possono permanere sul prodotto e attraverso la catena distributiva giungere al consumatore. Tali microrganismi sono responsabili sia delle alterazioni durante la conservazione nei punti di vendita sia di una eventuale potenziale patogenicità degli stessi prodotti avicoli.

I principali microrganismi presenti sulle carni avicole sono: *Pseudomonas* spp, *Micrococcus* spp, *Stafilococcus* spp, *Flavobacterium* spp, *Acinetobacter* spp, *Moraxella* spp, *E. coli*, Coliformi, *Listeria* spp,

Salmonella spp, Campylobacter spp, Streptococcus D., Clostridium perfringens, Lieviti e Muffe.

Come si osserva accanto a specie saprofiti e alteranti, il cui sviluppo incide sulla shelf-life del prodotto, viene osservata una ricca flora potenzialmente patogena responsabile delle principali infezioni e/o tossinfezioni nei consumatori.

È noto che microrganismi quali Salmonella spp, Campylobacter enterici, Clostridium perfringens e Stafilococcus aureus sono implicati in enteriti originate dal consumo di pollame.

Le salmonelle, in particolare, sono ritenute i principali agenti di trasmissione di infezioni associate al consumo di prodotti avicoli. La salmonellosi nel pollame, è spesso endemica in certe aree geografiche, per cui le autorità sanitarie da anni attuano campagne volte all'eradicazione definitiva di questa patologia negli allevamenti.

A questo scopo vengono studiati approfonditamente i meccanismi epidemiologici (reale distribuzione nell'ambiente, capacità di diffusione tra animali selvatici e domestici, il grado di associazione con altre infezioni intercorrenti), anche per accertare la potenziale attitudine di questo germe a sopravvivere e a moltiplicarsi in ambienti sfavorevoli.

Da qualche anno sono aumentate le segnalazioni di Campylobacter enterici e di Listeria monocytogenes in carni avicole e prodotti a base di pollo, anche se in questo caso i rischi di infezioni sono tuttora considerati inferiori a quelli provocati dalle salmonelle. Attualmente sono ancora in corso indagini per fare luce sulla correlazione tra la presenza dei sopracitati germi e le patologie associate a questi prodotti.

È opportuno osservare che i germi patogeni sopra riportati sono così diffusi negli allevamenti intensivi da essere considerati come dei costituenti abituali della normale flora intestinale e/o di superficie degli

animali vivi. Oltre tutto è ormai noto che nel pollo gli stessi Coliformi non fecali sono considerati autoctoni dell'intestino e quindi a tutti gli effetti possono essere considerati indicatori fecali. Da ciò risulta impensabile poterli eliminare completamente dagli allevamenti, dai macelli e dagli animali macelati, anche se a questo scopo vengono impiegati i più rigorosi piani di controllo.

E' necessario, per produrre carni con un basso livello di contaminazione, che la macellazione avvenga in impianti adeguati, osservando le buone norme di lavorazione (GMP) eseguendo la sanificazione delle superfici di lavorazione, degli utensili e delle attrezzature, la cui riuscita è accertata anche dal monitoraggio batteriologico; e infine è indispensabile l'istruzione, l'addestramento, l'aggiornamento e la motivazione del personale addetto alla linea di lavorazione.

ASPETTI IGIENICI-STRUTTURALI DEGLI IMPIANTI DI MACELLAZIONE

In base al D.Lvo 495/97 le strutture e gli impianti di macellazione devono essere progettati, costruiti e mantenuti in maniera tale da prevenire le situazioni che possono essere causa di contaminazione delle carni.

LE AREE ESTERNE

Tutte le aree esterne dell'impianto devono essere libere da detriti e rifiuti che possono attrarre insetti e roditori.

Le aree di transito devono essere adeguatamente inclinate e pavimentate per prevenire il deposito di polvere o il ristagno di liquidi.

Accumuli di rifiuti e scarti di lavorazione non sono tollerati nelle immediate vicinanze del macello. Essi devono essere deposti in contenitori chiusi ed adeguatamente contrassegnati.

Le aree esterne devono essere dotate di un locale o di una zona coperta sufficientemente vasta, per la sosta dei volatili prima della macellazione, che deve soddisfare alcuni requisiti: essere coperta, riparata, sufficientemente illuminata, con pavimento facilmente lavabile e disinfettabile, e provvista di impianto di ventilazione forzata per i periodi più caldi. Deve essere provvisto altresì di una postazione ed attrezzature adeguate per la pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto o delle gabbie utilizzate per i volatili destinati alla macellazione.

IL FABBRICATO

I locali devono essere progettati, costruiti, installati e mantenuti in buono stato.

Devono permettere una facile pulizia e impedire l'ingresso e lo sviluppo di animali indesiderati.

Pavimenti, pareti e soffitti devono essere costruiti con materiale resistente, impermeabile, imputrescibile e lavabile e tutti gli spigoli devono essere arrotondati.

I locali devono essere sufficientemente illuminati ed avere un'adeguata aerazione e ventilazione. I sistemi di drenaggio devono essere dotati di sifoni e sfiati.

Il locale per la macellazione deve essere abbastanza ampio in modo da consentire, in appositi reparti separati, le operazioni di stordimento e di dissanguamento, da un lato, e eventualmente di scottatura e di spiumatura dall'altro.

Il movimento degli addetti, d'attrezzature, materiali e prodotti devono essere tali da eliminare la possibilità di contaminazione crociata. Pertanto la progettazione di "locali accessori" agli ambienti di lavorazione propriamente detti, come il locale per l'eviscerazione, il locale imballaggio devono essere tali da limitare il più possibile la movimentazione del personale, tra locali a differente condizione igienica.

Penne, piume e sottoprodotti della macellazione non idonei al consumo umano devono essere asportati immediatamente.

Le finestre devono essere dotate di un sistema che impedisca l'ingresso d'insetti e altri animali indesiderabili e permettere un'aerazione adeguata.

Ogni comunicazione tra il locale della macellazione e i locali "accessori", diversa dall'apertura ridotta destinata al semplice passaggio

dei volatili macellati, deve essere munita di una porta a chiusura automatica.

SERVIZI IGIENICI E SPOGLIATOI

Le latrine, le sale ristoro, gli spogliatoi devono essere separati dall'area di lavorazione del pollame e mantenuti in modo igienicamente corretto.

Le latrine devono essere dotate di un numero sufficiente di lavandini opportunamente installati e forniti di condotta d'acqua calda e fredda. Le stazioni di lavaggio delle mani devono essere azionate a piede o a ginocchia oppure da cellula fotoelettrica. La segnaletica che indica la presenza di queste postazioni, deve essere chiara, scritta in lingua appropriata e ricordare agli addetti di lavarsi le mani il più frequentemente possibile.

Lavabi e latrine devono essere separati per il personale che manipola volatili vivi.

Il numero di docce, spogliatoi, latrine a sciacquone deve essere adeguato al numero di operatori.

POTABILITA' DELL'ACQUA

L'acqua non potabile non può essere utilizzata nella produzione di carne di pollame, né per il lavaggio dei pavimenti o di superfici che vengono in contatto con alimenti.

Essa può essere utilizzata per la produzione di vapore, per la lotta antincendio, il raffreddamento.

Le condotte devono essere distinguibili da quelle dell'acqua potabile.

ATTREZZI E UTENSILI

Tutti gli attrezzi e gli utensili utilizzati nella produzione della carne devono essere mantenuti in maniera tale da prevenire contaminazioni della carne di tipo microbiologico, chimico e fisico.

Tutti gli utensili e gli attrezzi devono essere impermeabili, non assorbenti, lisci e resistenti alla corrosione.

PULIZIA DEI COLTELLI E DELL'ATTREZZATURA

La pulizia dei coltelli, durante la lavorazione, deve avvenire per immersione negli appositi sterilizzatori.

E' obbligatorio mantenere la temperatura dell'acqua con ricambio continuo ad almeno 82°C e garantire un tempo d'esposizione delle superfici dell'attrezzo per almeno 30 secondi.

La pulizia delle attrezzature contaminate da feci e materiale patologico deve essere eseguita immediatamente.

Si procede all'asportazione dei residui e al lavaggio con acqua calda a bassa pressione.

L'IGIENE DEL PERSONALE

Il comportamento igienico del personale è uno dei più importanti obiettivi da raggiungere in un macello avicolo, per la salvaguardia della sicurezza dell'alimento prodotto.

Infatti è necessario escludere dalla lavorazione il personale portatore di una malattia infettiva, ferite aperte, ferite infette, foruncoli, piaghe che possono essere fonte di contaminazione.

Notevole importanza è data alle mani e alle altre parti esposte (unghia, avambracci e braccia) dell'operatore che sono i principali veicoli di diffusione della contaminazione.

Infatti le mani e le braccia devono essere lavate in un lavandino fornito d'acqua calda e fredda, nonché deve essere disponibile un dispensatore di sapone liquido oppure di una soluzione detergente/disinfettante.

QUANDO LAVARSI LE MANI

1. Dopo aver asportato materiale infetto o patologico e in caso di contaminazione con materiale fecale;
2. Dopo il contatto con la pelle del volatile;
3. Dopo l'uso della latrina;
4. Dopo aver tossito, soffiato il naso, usato il fazzoletto oppure fumato, mangiato, bevuto;
5. Dopo aver manipolato attrezzi o utensili insudiciati;
6. Ogni volta che sia necessario rimuovere polvere oppure per prevenire cross contaminazione per cambio di mansioni;
7. Tutte le volte che si passa dalla “zona sporca” alla “zona pulita”;
8. Immediatamente prima di iniziare a lavorare;
9. Prima di pulire l'attrezzatura e gli utensili;
10. Prima di aprire confezioni contenenti articoli vari.

ORNAMENTI PERSONALI

Anelli, braccialetti e altro tipo di monili non possono essere utilizzati durante la lavorazione.

INDUMENTI PERSONALI

Il vestiario di lavoro, compresi grembiuli, tute, camici indossati dal personale deve essere di materiale usa e getta oppure facilmente pulibile.

E' necessario sostituire giornalmente o più frequentemente, se necessario gli indumenti di lavoro.

TENUTA DEI CAPELLI

Il personale deve contenere i capelli e a tale scopo possono utilizzarsi cappelli e reti.

Infine è vietato bere, mangiare e sputare nelle aree di lavorazione.

FORMAZIONE DEL PERSONALE

E' specificatamente prevista dal D.P.R. 495/97. Il conduttore dello stabilimento deve organizzare corsi di formazione sugli aspetti igienici sanitari. Tali corsi devono essere progettati e realizzati in collaborazione con il Servizio Veterinario dell'ASL.

Deve essere coinvolto tutto il personale che lavora e viene a contatto con il pollame.

La formazione deve riguardare la corretta prassi operativa sia per la prevenzione delle zoonosi sia per la prevenzione della contaminazione batterica. Inoltre essa, al pari dell'aggiornamento, deve essere continua e comportare:

1. la distribuzione di materiale informativo;
2. l'organizzazione di riunioni interne;
3. la partecipazione a seminari esterni.

Ogni ciclo formativo deve essere documentato con un attestato di partecipazione.

LA MACELLAZIONE DEL POLLAME

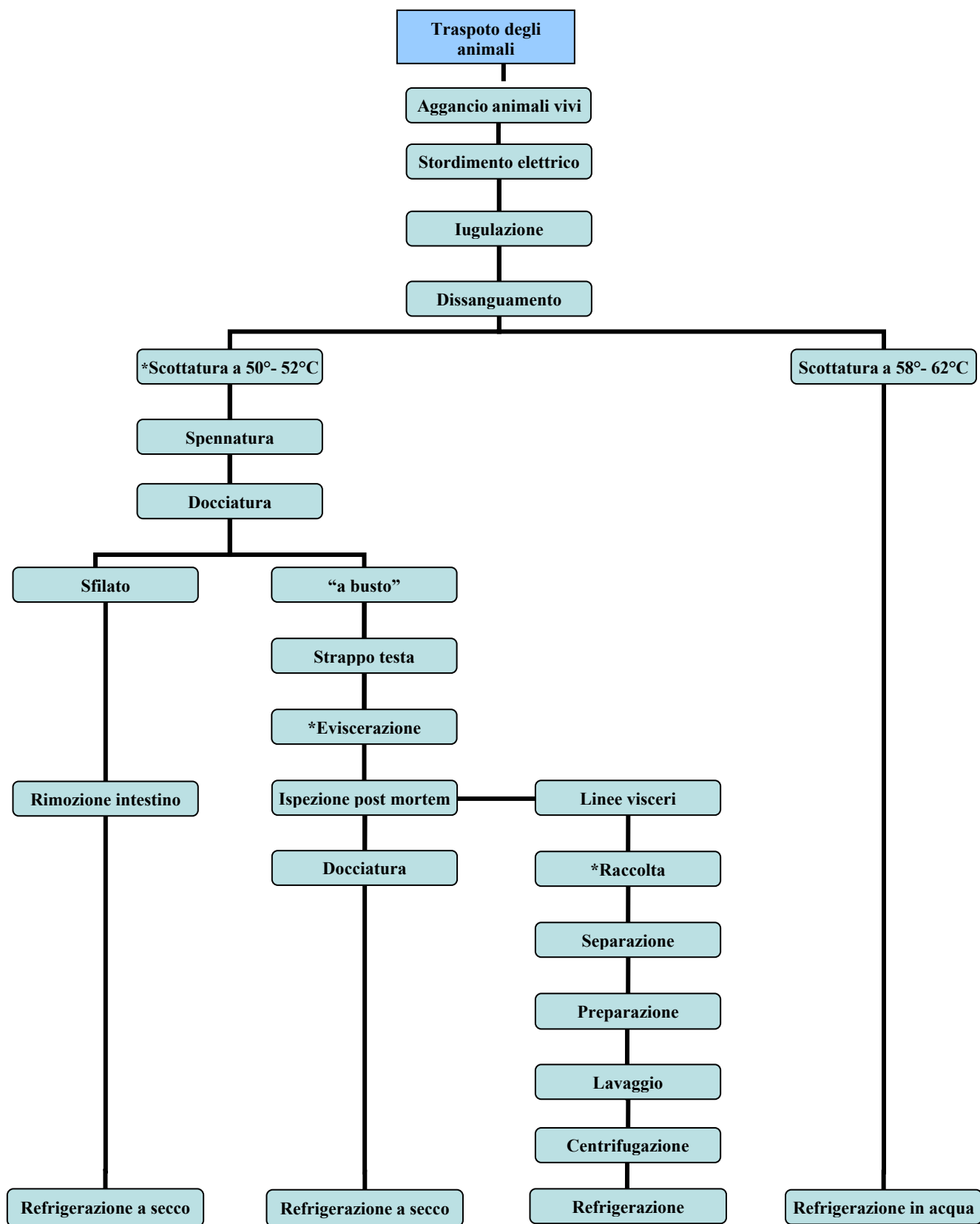


Diagramma operativo di un macello avicolo

I volatili vengono trasferiti dall'allevamento allo stabilimento di macellazione mediante automezzi autorizzati (camion, camion e rimorchio) in gabbie modulari studiate per ridurre le operazioni che prevedono l'intervento di manodopera, per limitare di conseguenza i danni da carico e scarico, per evitare che le deiezioni imbrattino i volatili che si trovano nelle gabbie sottostanti e infine per facilitare le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione.

Lo scarico delle gabbie modulari nello stabilimento di macellazione deve avvenire al più presto dopo il loro arrivo ed in un'area apposita, denominata area di sosta. Quest'ultima deve essere coperta, sufficientemente illuminata ma non troppo, con pavimento lavabile e disinfettabile, ed adiacente al macello.

I gruppi di volatili vengono separati in base alla loro provenienza in zone diverse dell'area di sosta; in questo modo è possibile identificare in ogni momento il gruppo di volatili, prima della macellazione.

Nell'area di sosta vanno create le condizioni più adeguate al fine di limitare mortalità, stress e calo peso. Nella stagione fredda ad esempio lo spazio tra le gabbie modulari nell'area di sosta può essere ridotto, mentre nella stagione estiva vi è la necessità di una maggiore circolazione d'aria tra le gabbie stesse.

Tutti i sistemi che hanno l'effetto di limitare i danni su menzionati, rientrano nella corretta applicazione della Direttiva 91/628/CEE, recepita con il D.Lvo 338/98, relativa alla protezione degli animali durante la macellazione o l'abbattimento.

L'autorità competente, in questo caso il Veterinario Ufficiale del macello, deve, innanzitutto, controllare l'attestato sanitario previsto dal D.P.R. 495/97, allegato IV e la dichiarazione di scorta per gli animali inviati nei macelli pubblici e privati come da D.Lvo 336/99, art. 15.

Successivamente deve provvedere al controllo di danni da carico e trasporto ed alla verifica dello stato sanitario dei volatili. L'esame clinico sul gruppo si esegue osservando attentamente i volatili nelle gabbie prima della macellazione, possibilmente 1-2 ore dopo il loro arrivo. Vengono presi in considerazione lo stato del sensorio, gli atteggiamenti particolari, l'impiumamento e l'imbrattamento delle penne ed in particolare di quelle pericloacali.

Tutte le possibili osservazioni prima della macellazione servono, inoltre, per distinguere eventuali gruppi che richiedono un controllo ispettivo post mortem specifico ed accurato.

Con l'inizio dello sgabbio e d'aggancio alla catena i "volatili vivi" appartenenti ad uno stesso gruppo sono avviati alle operazioni di macellazione.

Sono appesi manualmente per le zampe (metatarso) ai ganci della catena di macellazione, in un locale scarsamente illuminato, evitando fenomeni eccitativi, sofferenze e contusioni. I volatili appesi a testa in giù, possono essere avviati allo stordimento che deve determinare nel soggetto uno stato d'incoscienza così come previsto dalla normativa vigente.

Lo stordimento si realizza attraverso l'uso di uno "storditore elettrico" (a bagno d'acqua) che garantisce il passaggio di corrente dalla testa alle zampe, fino ai ganci della catena di macellazione. Il voltaggio e l'amperaggio di quest'apparecchio sono in relazione alla specie del volatile macellato. Si può ricorrere anche allo stordimento in atmosfera di CO₂ ma il sistema richiede tempi più lunghi e costosi.

E' questa una fase particolarmente importante perché se svolta in maniera corretta evita danni alla carcassa e alle ali derivanti soprattutto dal non corretto dissanguamento.

Allo stordimento segue l'operazione d'uccisione, che può essere eseguita con metodiche differenti, ma quella utilizzata più comunemente è la iugulazione esterna, mediante recisione dei grossi vasi del collo attraverso una ferita della pelle in corrispondenza della regione della gola.

A tale operazione segue il dissanguamento che avviene in un canale di raccolta, generalmente in acciaio inox, posto sotto il percorso di un tratto della catena di macellazione. Il tempo di dissanguamento è in relazione alla specie ed è in ogni caso condizionato dalla velocità della catena di macellazione. In genere il tempo oscilla intorno ai 3 minuti.

Il volatile dopo il dissanguamento arriva nella vasca di scottatura con acqua calda alla temperatura di circa 51-52°C (e in ogni modo variabile a seconda delle specie di volatili e del periodo dell'anno), mantenuta in agitazione mediante l'immissione d'aria. La corretta e costante temperatura dell'acqua della vasca di scottatura ha la funzione di dilatare i follicoli delle penne e quindi di agevolare l'operazione di spiumatura, che deve essere immediata e completa.

Qualunque sia la capacità delle vasche e il ricambio d'acqua, dopo un paio di ore di funzionamento degli impianti si raggiungono normalmente conte di aerobi mesofili dell'ordine di $10^6 - 10^7$ ufc/ml di acqua, di cui $10^4 - 10^5$ ufc di enterobatteri, conte che si mantengono più o meno costanti per tutta la giornata lavorativa. Le temperature di 50°-52°C, infatti, sono in grado di uccidere sicuramente soltanto i microrganismi psicrofili e psicrotrofi, mentre la maggior parte dei microrganismi introdotti dai volatili vivi, che sono mesofili, trovano condizioni estremamente favorevoli alla loro sopravvivenza, non solo e non tanto per l'azione protettiva del materiale organico che viene ad

accumularsi, quanto piuttosto per quella del pH, che si mantiene a valori di 6-7.

Particolarmente grave, in questa fase, è la sopravvivenza dei patogeni, sia perché essi da pochi animali infetti possono essere trasferiti a moltissimi altri (c.d. “contaminazione crociata”), sia perché, nella successiva fase di spennatura, oltre a contaminare impianti, possono penetrare nei follicoli rimasti beanti o in altre piccole soluzioni di continuo della cute, da dove non possono più essere rimossi nemmeno con docciature ripetute e abbondanti.

Un altro punto importante da considerare è che, nel corso della scottatura per immersione può verificarsi anche una contaminazione del sistema respiratorio e di quello circolatorio.

Le gravi carenze igieniche insite nel procedimento di scottatura in vasca hanno stimolato da qualche tempo molti ricercatori a trovare metodiche alternative, che consentono di eliminare almeno in parte gli inconvenienti sopra esposti. In particolare si è tentato di migliorare le condizioni microbiologiche generali, riducendo al massimo le possibilità di contaminazione crociata.

Tra i sistemi provati a livello sperimentale, quelli che hanno dato i risultati migliori, prevedevano la scottatura a spruzzo o a vapore dei singoli volatili, oppure la loro immersione, previa docciatura, in una o più vasche disposte in serie, nelle quali l’acqua pulita era spinta in senso contrario alla direzione di progressione della catena. E’ stata anche proposta una nuova docciatura dei volatili con acqua pulita all’uscita delle vasche.

Purtroppo qualsiasi modificazione radicale degli impianti comporta spese rilevanti, che non sembrano trovare ancora motivazioni sufficienti,

soprattutto perché i vantaggi che ne possono derivare sotto il profilo igienico non sono facilmente quantificabili.

Verrebbero inoltre ad aumentare considerevolmente i consumi d'acqua e si creerebbero nuovi problemi per lo smaltimento delle acque luride.

In base a queste considerazioni non sembra prevedibile un sostanziale miglioramento delle condizioni attuali in tempi brevi. Questo rende ragione del rinnovato interesse per l'aggiunta all'acqua di scottatura di sostanze chimiche, che siano in grado di ridurre la carica batterica totale e, soprattutto, quella dei più importanti microrganismi patogeni. Tali sostanze il cui impiego necessiterebbe comunque dell'approvazione da parte delle autorità sanitarie competenti oltre ad essere efficaci, economiche e facili da usare, devono anche rispondere all'imprescindibile esigenza di non provocare alterazioni delle caratteristiche organolettiche delle carni e di non lasciare residui nelle stesse.

Va comunque considerato che qualsiasi trattamento, anche il più efficace, non sarà mai in grado di eliminare completamente i patogeni dell'acqua di scottatura e tanto meno di risolvere il problema della presenza dei patogeni stessi nell'apparato digerente.

L'operazione di spiumatura è eseguita da macchine poste in serie che agiscono tramite particolari dita di gomma che asportano le penne dal corpo del volatile. Sulle macchine spiumatrici si trovano docce d'acqua tiepida che garantiscono la pulizia della carcassa dalle penne e la riduzione, per quanto possibile, della carica microbica.

Il piumaggio sporco o imbrattato di feci condiziona in maniera significativa l'igiene di questa procedura con esiti importanti per quanto riguarda la conservabilità e la possibile presenza di germi patogeni sulla superficie della carcassa.

La spiumatura è un'operazione che comporta forse i rischi maggiori di contaminazione crociata in tutta la catena di macellazione. E' stato, infatti, dimostrato che un solo volatile contaminato da un determinato ceppo microbico può provocare la contaminazione di più di duecento volatili che passano successivamente.

Nonostante in questa fase vengano adottati normalmente dei sistemi di doccia continua con acqua potabile, la velocità di progressione della catena e quella di rotazione delle dita e dei flagelli di gomma sono tali che non si può pensare che la carica microbica superficiale possa essere ridotta. Molto spesso, invece, avviene proprio il contrario. Infatti, per effetto della compressione esercitata dalle dita di gomma, si può verificare una fuoriuscita di materiale fecale, che viene poi rapidamente distribuito ai volatili successivi.

E' inoltre da considerare che l'atmosfera caldo-umida che si crea all'interno delle spennatrici può favorire la moltiplicazione di alcuni microrganismi già durante la lavorazione, soprattutto se negli impianti esistono anfrattuosità nelle quali possano annidarsi residui di penne. Infine, la particolare conformazione delle dita di gomma ne rende estremamente difficile la pulizia e la disinfezione alla fine della giornata lavorativa, cosicché può venire a costituirsi un vero e proprio serbatoio di contaminazione per la produzione del giorno successivo.

La rifinitura della deplumazione è effettuata a mano dalle operaie in un reparto separato fisicamente.

Dopo l'operazione di spiumatura segue l'eviscerazione. Tale operazione per molto tempo è stata considerata una delle più critiche dal punto di vista igienico, sia che l'asportazione dei visceri fosse effettuata manualmente, sia con evisceratrici meccaniche, perché la rottura dell'intestino si verificava con una certa frequenza; si rendevano inoltre

necessari ulteriori interventi per la rimozione dei polmoni, che veniva effettuata o manualmente o con la c.d. “pistola aspira-polmoni”, facendo aumentare le occasioni di contaminazione crociata soprattutto nella cavità toraco-addominale.

Attualmente l'eviscerazione manuale, negli impianti di una certa dimensione, è stata abbandonata; le evisceratrici meccaniche sono state notevolmente migliorate (con il pacchetto dei visceri addominali vengono estroflessi anche i polmoni) e, sempre che la taglia degli animali in catena sia sufficientemente uniforme, la rottura dell'intestino costituisce un evento eccezionale.

In queste condizioni è sufficiente la docciatura frequente delle superfici delle carcasse e delle parti meccaniche che vengono direttamente a contatto con loro per ridurre sensibilmente la contaminazione fecale delle carcasse stesse.

Qualora, invece, l'imbrattamento con materiale della cavità si verificasse con una certa frequenza, sarebbe opportuno ricorrere a speciali attrezzature congegnate in modo da lavare le carcasse sia all'interno, sia all'esterno.

In ogni caso un buon lavaggio alla fine della lavorazione è in grado di ridurre la contaminazione delle carcasse di una decina di volte.

Affinché tale condizione si mantenga, devono essere ridotti al minimo i contatti manuali o con superfici (tavoli, nastri trasportatori, tramogge, etc.) sia prima, sia dopo la refrigerazione, fino al confezionamento.

E' comunque sempre raccomandabile l'asportazione dalle carcasse, prima della refrigerazione, del lembo di pelle che resta libero dopo la rimozione del collo. Qui, infatti, per la posizione mantenuta dalle carcasse lungo tutto il percorso in catena, vengono a raccogliersi moltissimi microrganismi, alcuni dei quali, come le salmonelle,

aderiscono specificamente al tessuto connettivo, che imbibendosi d'acqua, si rigonfia notevolmente e non ne consente più la rimozione nemmeno con grandi quantità d'acqua.

Per quanto riguarda le carcasse parzialmente eviscerate c.d."sfilate", verificandosi normalmente un imbrattamento della cavità addominale da parte di materiale fecale, che non è rimosso, vengono inevitabilmente a ritrovarsi in questa sede livelli più elevati di contaminazione fecali, ivi compresi i più comuni enteropatogeni.

A questo si aggiunga che anche la mancata asportazione della testa e delle zampe può comportare un maggior rischio di contaminazione crociata nel corso delle successive manipolazioni rispetto alle carcasse preparate "a busto".

L'eviscerazione deve essere praticata da personale bene addestrato che rispetti, nell'esecuzione del lavoro, alcune fondamentali norme d'ordine tecnico ed igienico. I volatili macellati devono comunque essere aperti in modo tale che le cavità e tutti i visceri pertinenti possono essere ispezionati.

Nella preparazione industriale delle carcasse "a busto", i visceri estroflessi dalle evisceratrici, una volta superata favorevolmente l'ispezione post-mortem, vengono rimossi dalle carcasse e avviati, mediante nastri trasportatori o docce aperte a scorrimento d'acqua continuo, ad apposite linee di lavorazione. Si procede innanzitutto alla separazione di cuore e fegato. Quest'ultimo, privato della cistifellea, può essere o no separato dal cuore. Il resto del pacchetto dei visceri viene immediatamente convogliato ad un separatore che avvia i ventrigli ad una apposita linea di lavorazione (apertura, svuotamento, rimozione della cuticola interna di rivestimento e dello strato di grasso esterno), mentre le parti non commestibili vengono avviate verso il sistema di

raccolta dei rifiuti. I colli, senza il loro rivestimento cutaneo vengono generalmente separati dalle carcasse prima dell'eviscerazione. Le diverse frattaglie, una volta isolate, vengono sottoposte separatamente a lavaggio, centrifugazione e refrigerazione e poi confezionate. Nonostante la normativa vigente consenta la reintroduzione nelle carcasse di pacchetti di visceri, adeguatamente confezionati e composti di un fegato, un cuore, un ventriglio e un collo provenienti da volatili della stessa partita, nel nostro Paese questa operazione non viene effettuata e le diverse frattaglie vengono normalmente confezionate e commercializzate separatamente, ad eccezione dei colli, che vengono più spesso avviati alla separazione meccanica, o utilizzati per la preparazione di conserve per uso animale. Senza entrare in dettagli, è ovvio che la lunga serie di operazioni previste per la preparazione delle frattaglie non può non influire negativamente sulle loro caratteristiche microbiologiche, sia per i ripetuti contatti con materiale fecale, che come si è visto, contiene molto spesso cariche elevate di *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, e *Clostridium perfringens*, sia per la prolungata esposizione a cariche elevate di microrganismi deterioranti che albergano normalmente negli impianti. Al momento della separazione dalle carcasse le cariche batteriche totali di durelli, fegati e cuore sono mediamente, di $10^4 - 10^5$ /g, di cui $10^3 - 10^4$ enterobatteriacee totali/g; i colli risultano più inquinati con cariche batteriche totali di circa 10^6 /g, di cui $10^4 - 10^5$ /g enterobatteri totali. Il lavaggio delle frattaglie con quantità abbondante di acqua potabile il più precocemente possibile rispetto alla loro separazione dalle carcasse, ha dimostrato di ridurre notevolmente sia le cariche batteriche totali sia quelle delle enterobatteriacee, come pure quelle dei coliformi, enterococchi, *Salmonelle* e stafilococchi. Particolarmente critiche sotto il profilo

igienico risultano essere le condizioni dei visceri nei grandi macelli industriali, dove le grandi quantità di frattaglie lavorate nel corso di un giornata fanno accumulare numeri elevatissimi di microrganismi negli impianti, che, per la complessità di struttura e di dimensione, non possono poi essere facilmente sottoposti alle indispensabili operazioni di pulizie e di disinfezioni. In queste condizioni si riscontrano facilmente, al momento della produzioni, cariche batteriche totali di 10^7 - 10^8 /g con valori di enterobatteri di poco inferiori. Al contrario se i visceri prelevati manualmente vengono immediatamente lavati sotto acqua corrente e subito refrigerate, le cariche batteriche totali al momento del confezionamento risultano essere mediamente di 10^4 - 10^5 /g di cui solo 10^2 - 10^3 /g enterobatteri totali e circa 10^2 enterococchi. Numerose sono in letteratura le segnalazioni della presenza di *Campylobacter jejuni* nei visceri di diverse specie di volatili esaminati subito dopo l'eviscerazione. Christopher e Coll. (1982) ad esempio, in fegati e ventrigli di pollo hanno riscontrato una positività dell'85% e dell'89%, rispettivamente, con livelli che nel 50% circa dei campioni positivi erano superiori a 1.100/g. Livelli da meno di 20 a 900/g sono stati segnalati da Hartog e Coll. (1983) in fegati di pollo e da \log_{10} 1,30 e 2,80 da Kasrazadeh e Genigeorgis (1987) in cuori, ventrigli e fegati di anatre, che presentavano percentuali di positività del 6,20 e 34%, rispettivamente.

Al fine di una corretta ed efficace visita ispettiva post mortem, il Veterinario Ufficiale deve disporre di una postazione adeguata e ben identificabile nella catena di macellazione. Questa deve essere collocata immediatamente dopo l'eviscerazione sia essa manuale od automatizzata.

L'aspetto della singola carcassa, degli organi interni, così come la visione della cavità toraco-addominale e lo stato di digiuno devono

fornire al Veterinario Ufficiale un significativo e rappresentativo giudizio igienico sanitario del gruppo in fase di macellazione.

A completamento della visita ispettiva post mortem si rende necessario, in taluni casi, effettuare esami di laboratorio, volti ad escludere l'eventuale presenza sulla cute, nel muscolo o negli organi commestibili di residui di farmaci o di sostanze non autorizzate, ma utilizzate in alcune fasi della lavorazione (es. disinfettanti) o di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni.

Al termine dell'esame ispettivo post mortem le carcasse devono essere sottoposte ad opportuna metodica di refrigerazione.

MODIFICAZIONI DELLE MICROFLORA DETERIORANTE SULLE CARCASSE LUNGO LA LINEA DI MACELLAZIONE

La microflora deteriorante è costituita da microrganismi psicrotrofi (capace di moltiplicarsi più rapidamente a 20°C e, sempre più lentamente fino a temperature prossime a 0°C), appartenenti a diversi generi, dei quali i più frequenti sembrano essere *Acinobacter*, *Moxerella*, *Pseudomonas* pigmentati e non pigmentati, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*. In particolari condizioni possono essere rappresentati anche lieviti e lattobacilli. Si è già fatto cenno al fatto che un certo numero di microrganismi psicrotropsi di origine ambientali viene introdotto nei macelli con gli animali vivi e che nel corso della scottatura, anche a soli 50°-52°C, questi vengono completamente eliminati. La microflora deteriorante che si ritrova sulle carcasse alla fine della lavorazione ha quindi origine dagli impianti. Ogni macello ha una sua microflora deteriorante tipica, entro la quale i generi sopra indicati possono ritrovarsi in percentuali diversi a seconda delle condizioni ambientali della zona di installazione del macello stesso (un ruolo particolare nella distribuzione di questi microrganismi ha ovviamente l'acqua), dell'impiego di disinfettanti diversi, che ne possono effettuare una diversa selezione, e della temperatura ambientale, che può favorire la moltiplicazione più rapida di alcuni rispetto ad altri. Un aumento significativo della microflora deteriorante si osserva già sulle carcasse al passaggio dalle spennatrici e diventa ancor più significativo dopo l'eviscerazione, la refrigerazione e tutte le successive operazioni che comportano manipolazioni e/o contatti con attrezzature, fino al confezionamento.

INFLUENZA DEL METODO DI REFRIGERAZIONE SULLE CONDIZIONI MICROBIOLOGICHE DELLE CARCASSE

Nonostante in Italia venga attualmente utilizzata soltanto la refrigerazione “a secco” poiché la quasi totalità delle carni avicole di produzione nazionale viene commercializzata allo stato di refrigerazione, un cenno alla refrigerazione in acqua si rende comunque opportuno in considerazione del fatto che la normativa vigente – in attuazione delle direttive CEE in materia – ne consente l'utilizzazione. Da un punto di vista igienico la refrigerazione “a secco” dovrebbe offrire qualche vantaggio rispetto a quella per immersione, soprattutto perché le possibilità di contaminazione crociata dovrebbero essere più limitate. Va tuttavia considerato che la scottatura a 50°-52°C (anziché a 58°-60°C) utilizzata in vista della refrigerazione “a secco”, favorisce una maggiore contaminazione delle carcasse fin dalle prime fasi della lavorazione. Inoltre mentre le carcasse che vengono refrigerate in acqua devono subire un lavaggio preliminare – con quantità di acqua potabile varianti da 2,5 l a 6 l – prima dell'immersione nelle vasche di refrigerazione, dove subiscono un ulteriore lavaggio sempre con acqua potabile in quantità variabile da uno 1,5 l a 3,5 l a secondo del loro peso, le carcasse da refrigerare “a secco” vengono talvolta lavate solo simbolicamente (20-100ml d'acqua) e al momento del confezionamento possono presentare cariche batteriche più elevate delle prime (Mead, 1980).

SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO

L'allevamento avicolo intensivo, integrato a grandi complessi industriali deve essere inserito in un sistema di filiera dove i controlli di tutti gli anelli di congiunzione devono assicurare carni e/o prodotti preparati o trasformati ineccepibili da un punto di vista igienico-sanitario.

Nell'ambito dello svolgimento del dottorato ho inteso approfondire alcuni aspetti nella filiera di produzione del settore avicolo e precisamente il lavoro è stato articolato in 4 fasi.

- 1) Osservazioni sulle condizioni di trasporto del pollame destinato alla macellazione;
- 2) Monitoraggio microbiologico delle condizioni di lavorazioni in un macello avicolo;
- 3) Raffronto tra metodo distruttivo e non per le analisi microbiologiche su carcasse avicole;
- 4) Inattivazione di *Listeria innocua* in Tryptic Soy Broth e carni trite di pollame mediante le Alte Pressioni Idrostatiche.

1) OSSERVAZIONI SULLE CONDIZIONI DI TRASPORTO DEL POLLAME DESTINATO ALLA MACELLAZIONE

Il primo aspetto da considerare nella macellazione degli animali è il trasporto dall'allevamento al macello. In tale settore ampio è stato l'intervento da parte del legislatore, dalla Convenzione di Parigi del 1968 sulla protezione degli animali nei trasporti internazionali, promossa dal Consiglio d'Europa, alla direttiva 91/628/CEE, recepita in Italia con il D.Lgs. 30 dicembre 1992, n. 532, modificata dalla direttiva 95/29 CE, recepita dal D.Lgs 20 ottobre 1998, n. 388.

Il trasporto dall'allevamento al macello deve essere monitorato, considerato che il carico, il viaggio e lo scarico sono eventi stressanti, che, anche se con una certa variabilità di specie, possono accentuare da un lato problematiche già presenti in allevamento e dall'altro influenzare il livello di contaminazione delle carcasse nonché la qualità delle carni.

Considerata l'importanza dell'argomento abbiamo ritenuto interessante verificare le condizioni del trasporto di volatili destinati alla macellazione.

MATERIALI E METODI

Dal periodo invernale al periodo estivo dell'anno 2003, in un macello avicolo della nostra regione, riconosciuto CEE, abbiamo verificato le condizioni di trasporto sia di broilers che di galline ovaiole a fine produzione.

I volatili erano trasportati dall'allevamento al macello in gabbie modulari, disposte l'una sull'altra sui veicoli da dove erano scaricate e lasciate nell'area di sosta per tempi variabili in base al numero di animali da macellare e alla velocità della catena di macellazione.

L' area di sosta era coperta, riparata, sufficientemente illuminata, provvista di pavimento facilmente lavabile e disinfettabile ma sprovvista d'impianto di ventilazione forzata per i periodi più caldi. Nello stabilimento in esame erano quotidianamente macellati circa 12000 capi per sei giorni la settimana. Parte degli animali macellati era commercializzata come pollo sfilato o pollo a busto, parte era destinata al sezionamento e al confezionamento e conferita alla distribuzione.

Le verifiche hanno riguardato 44 veicoli, di cui 18 trasportavano broilers (numero di soggetti 47.500 con un peso oscillante tra 2,7 a 3,6 kg), e 26 trasportavano galline ovaiole (numero di soggetti 107.894 con un peso oscillante tra 1,7 e 2,2 kg).

Sono stati valutati:

- l'autorizzazione al trasporto
- la documentazione di accompagnamento al macello dei volatili da cortile;
- la provenienza degli animali e durata del trasporto;
- il numero e dimensioni delle gabbie per camion;
- il numero di animali per camion;

- la densità degli animali per gabbia;
- lo stato igienico delle gabbie;
- il tempo di sosta presso lo stabilimento;
- le condizioni cliniche dei soggetti allo scarico;
- il tasso di mortalità pre-macellazione.

RISULTATI

❖ Verifica dell'autorizzazione al trasporto

Tutti i trasportatori risultavano muniti dell'autorizzazione richiesta all'art. 5 del D.L.vo 532/97.

❖ Verifica della documentazione di accompagnamento al macello dei volatili da cortile

Per 6 carichi la documentazione di accompagnamento al macello dei volatili (art. 13, comma I lettera c del D.P.R. 495/97, semplificata in parte dal Decreto 11 febbraio 2003) era incompleta.

In 2 casi infatti mancava il codice aziendale e risultava incompleta la parte riguardante i trattamenti terapeutici, in tre casi non era riportato il numero di animali trasportati e in due casi la documentazione era stata rilasciata da oltre 72 ore.

La macellazione è stata in ogni caso autorizzata dal veterinario ufficiale per rispettare le regole del benessere animale così come contemplato al punto 25 lettera b capitolo VI del D.P.R. 495/97.

❖ Provenienza degli animali e durata del trasporto

Gli animali provenivano da allevamenti regionali e nazionali.

Dei 44 veicoli considerati, n. 35 rientravano nei trasporti effettuati su di una distanza superiore ai 50 Km e risultavano quindi disciplinati dal D.L.vo 388/98; n. 9 rientravano nei trasporti effettuati su una distanza inferiore ai 50 km.

Il trasporto, della durata media di 3 ore, non ha quasi mai superato le 8 ore. Tale ultima situazione si è verificata per 5 veicoli che non avevano compilato il ruolino di marcia.

❖ **Numero e dimensioni delle gabbie per camion**

Le gabbie, trasportate su veicoli, avevano base rettangolare (55 x 110 cm) ed altezza di 25 cm con 2 aperture, di cui una sulla faccia laterale corta e una sulla faccia lunga.

Per ogni singola gabbia la superficie utilizzabile per il trasporto animale era pari a 6050 cm².

La maggior parte degli autocarri, indipendentemente dal numero di soggetti presenti, trasportava 320 gabbie, disposte in due colonne.

Su 4 veicoli il numero di gabbie era pari a 280; in 2 era di 98, in un veicolo con rimorchio le gabbie erano 560.

❖ **Numero di animali per camion**

Il numero di animali trasportati, in base alla capacità contenitiva del veicolo, variava da 1274 a 9500 per le galline ovaiole e da 2500 a 2900 per i broilers.

Complessivamente gli automezzi controllati hanno trasportato 47500 broilers e 107894 galline ovaiole.

❖ **Densità degli animali per gabbia**

La densità, che esprime il rapporto tra la superficie indicata (cm²) e il peso vivo dei soggetti trasportati, può variare in base ai soggetti, ma anche allo stato fisico degli animali, alle condizioni meteorologiche e alla durata probabile del tragitto.

Per volatili di peso vivo compreso tra 1.6 e 3 kg la densità deve essere pari a 160 cm²/kg, mentre per i volatili di peso vivo superiore a 3 kg ma inferiore a 5 kg la densità deve essere di 115 cm²/kg.

Sia per i broilers che per le galline ovaiole la densità stabilita dalla normativa è stata sempre rispettata.

Non è stata tuttavia mai considerata la possibile variazione per le eventualità di cui sopra.

In base alle nostre osservazioni le condizioni meteorologiche hanno influito sulla percentuale di mortalità (Fig.n. 1).

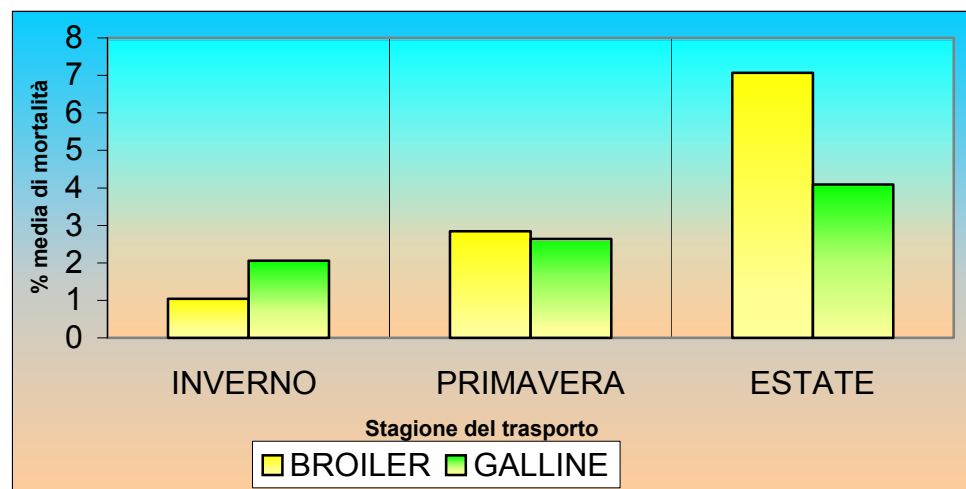


Fig. n.1

Per i broilers è stata riscontrata inoltre un'equa distribuzione degli animali per gabbia (8-12 soggetti) mentre per le galline ovaiole il numero riscontrato arrivava a volte fino a 20 soggetti.

❖ **Stato igienico delle gabbie**

Il D.P.R. 587/93, al comma 5 dell'art.15, prevede che “le gabbie e i mezzi di trasporto devono essere concepiti in modo da evitare la perdita di escrementi e ridurre il più possibile la perdita di piume durante il trasporto, facilitare l'osservazione dei volatili, consentire la pulitura e la disinfezione”.

Al comma 6 è previsto altresì che ” i mezzi di trasporto e, salvo siano a perdere, i contenitori, le scatole e le gabbie, devono prima del carico e dopo lo scarico, essere puliti e disinfettati”.

Le condizioni igieniche delle gabbie sono risultate sovente non accettabili ed inoltre, tra una fila e l'altra di gabbie, vi erano sistemi atti a prevenire l'imbrattamento dei soggetti sottostanti.

Dopo la fase di scarico veniva effettuato solo il lavaggio delle gabbie e del mezzo di trasporto ma non la disinfezione.

❖ **Tempo di sosta presso lo stabilimento**

Il tempo di sosta prima della macellazione è risultato variabile da un min di 0 a un max di 13 ore per i broilers, da un min di 0 a un max di 24 ore per le galline ovaiole.

A tal proposito è stata riscontrata correlazione tra il tempo totale trascorso nelle gabbie e tasso di mortalità (Fig.n.2).

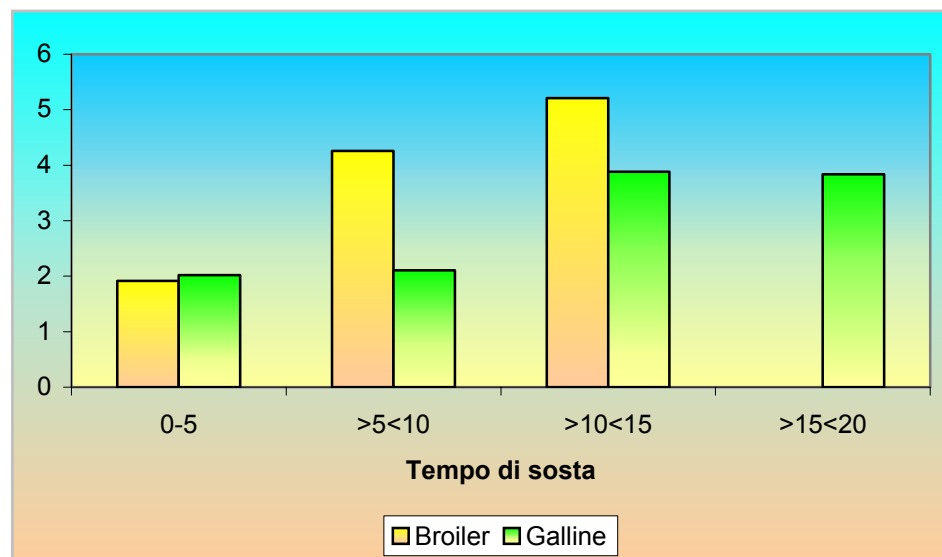


Fig. n.2

❖ **Condizioni cliniche dei soggetti allo scarico**

L'esame clinico ha permesso di constatare che le galline ovaiole presentavano imbrattamento del piumaggio (58% dei veicoli), irregolarità degli atti respiratori (46% dei veicoli), atteggiamenti particolari (15% dei veicoli).

I broilers manifestavano atteggiamenti particolari quasi costantemente, e irregolarità degli atti respiratori più raramente (37% dei veicoli).

❖ **Tasso di mortalità pre-macellazione**

Per ogni carico d'animali all'arrivo allo stabilimento di macellazione è stato rilevato il numero di soggetti morti.

La percentuale di mortalità per quanto riguarda le galline ovaiole variava dallo 0,6 al 6%.

Per i broilers invece la mortalità oscillava tra valori dallo 0,5 al 16,6%.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

In base alle osservazioni effettuate è necessario focalizzare l'attenzione sui seguenti punti:

- a) corretta e completa compilazione del documento di accompagnamento al macello dei volatili da cortile secondo quanto previsto dal Decreto dell'11/02/2003;
- b) esecuzione del lavaggio e della disinfezione delle gabbie modulari e dei veicoli dopo lo scarico;
- c) disposizione di un programma per i ritiri e la macellazione onde evitare lunghe soste dei volatili prima della macellazione. È stata riscontrata correlazione tra il tempo trascorso nelle gabbie e il tasso di mortalità come d'altronde rilevato da altri autori;
- d) valutazione della densità del carico in base al peso dei soggetti trasportati, allo stato fisico degli animali, alle condizioni meteorologiche e alla durata del tragitto. E' stato infatti osservato che le condizioni meteorologiche hanno influito sulla percentuale media di mortalità.

I punti c e d risultano importanti al fine di ridurre i soggetti morti all'arrivo che costituiscono la causa principale di esclusione al macello e di maggiore perdita economica.

E' alla visione del Consiglio e del Parlamento Europeo la proposta di regolamento del Consiglio sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate, che modifica le direttive 609/1986/CEE e 93/119/CE. In tale proposta si riconosce che il trasporto è l'ambito più controverso per quanto concerne il benessere degli animali, si evidenziano le correlazione tra benessere degli animali, sicurezza alimentare e salute degli animali e si propone la revoca di tutte le norme

comunitarie vigenti in materia di protezione degli animali durante il trasporto con l'intento di stabilire condizioni più rigorose per i trasportatori, che operano su lunghe distanze, aggiornare le regole in materia di tempi di viaggio e di spazio per gli animali, migliorare la formazione obbligatoria del personale ed estendere la portata di tale obbligo al personale operante nei mercati e nei centri di raccolta, proibire il trasporto di animali molto giovani e fissare definizioni per gli animali inidonei al trasporto, fissare regole più rigorose per il trasporto dei cavalli, aggiornare le norme tecniche per i veicoli su strada, introdurre requisiti specifici per tutte le navi che trasportano animali vivi operanti da porti comunitari, rafforzare le responsabilità dei trasportatori come anche quelle di tutti gli altri operatori che si occupano del trasporto di animali, ribadire il ruolo delle autorità competenti nella supervisione delle operazioni di trasporto e rafforzare la cooperazione tra i servizi interessati, rafforzare gli strumenti ai fini del controllo e di una migliore applicazione.

Indubbiamente tale proposta mostra un approccio organico al problema e l'adeguata applicazione di quanto in essa contenuta sarà un elemento chiave per migliorare la situazione attuale. Pur tuttavia risulterebbe utile, a nostro avviso, anche per questo settore, l'imposizione di un sistema di responsabilizzazione interno alle stesse aziende trasportatrici che potrebbe costituire una garanzia autocertificata per la qualità del trasporto e per la sua conformità alle normative vigenti. L'autocertificazione della qualità dei servizi offerti da una azienda qualificherebbe peraltro il controllo ufficiale che dovrebbe rilevare, unitamente alla eventuali infrazioni alle norme di legge, i meccanismi attraverso i quali l'azienda attua l'autocontrollo.

2) MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO DELLE CONDIZIONI DI LAVORAZIONI IN UN MACELLO AVICOLO

La contaminazione delle carcasse può essere di tipo intrinseco o estrinseco.

La contaminazione intrinseca riconosce come cause un eventuale stato di batteriemia intravitale al momento della macellazione, oppure l'uso di strumenti e/o tecniche di abbattimento non effettuate in maniera ottimale. Laddove, però, alla visita ispettiva non emergano particolari sospetti al riguardo, la contaminazione profonda delle carcasse può non essere oggetto di considerazione .

La contaminazione superficiale delle carcasse, invece, deve essere sempre valutata attentamente, vista la sua inevitabilità e la molteplicità delle fonti di inquinamento.

Lo stato di salute degli animali, l'igienicità delle differenti operazioni di macellazione, la scrupolosa pulizia degli operai, la detersione e la disinfezione accurata di apparecchi e utensili di lavoro costituiscono altrettanti fattori che possono condizionare il numero iniziale di microrganismi presenti sulle carcasse.

La conclusione generale è che, anche applicando tutte le precauzioni igieniche che nella pratica possono essere attuate, in presenza non solo di strutture adeguate ma anche di personale sufficiente in numero e ben addestrato, le carcasse possono, in maggior o minor misura, in relazione anche con quelle che sono le operazioni tipiche di ogni specie, risultare contaminate da microrganismi alteranti o patogeni.

Per questi motivi, il settore delle carni è sempre stato oggetto di attenzione particolare da parte del legislatore e numerosi, specifici e

circostanziati sono stati i provvedimenti normativi, riguardanti il settore delle carni, emanati dal nostro paese e dall'Unione Europea.

Oggi anche agli operatori è richiesto di controllare e garantire la sicurezza dei loro prodotti. Essi, infatti, devono effettuare controlli regolari delle condizioni igieniche generali della produzione, attraverso l'applicazione dell'autocontrollo, opportunamente documentato e sviluppato in conformità con i principi del sistema H.A.C.C.P

DECISIONE 2001/471/CE

La decisione 2001/471/CE dell' 8 giugno 2001 fissa le norme per i controlli regolari delle condizioni igieniche generali, svolti dagli operatori negli stabilimenti, conformemente alla direttiva 64/433/CEE sulle condizioni sanitarie per la produzione e l'immissione nel mercato di carni fresche ed alla direttiva 71/118/CEE relativa a problemi sanitari in materia di scambi di carni fresche di volatili da cortile.

La decisione attribuisce ai produttori la responsabilità della sicurezza dei prodotti, disponendo che gli operatori degli stabilimenti di carne devono effettuare controlli regolari delle condizioni igieniche generali della produzione, attraverso l'applicazione di una procedura permanente d'autocontrollo opportunamente documentata e sviluppata in conformità con principi H.A.C.C.P. , come previsto nell'articolo 1.

Mentre la necessità di procedere al regolare controllo delle condizioni igieniche negli stabilimenti non costituisce una novità, l'applicazione del modello H.A.C.C.P. rappresenta un grosso cambiamento di approccio rispetto a quanto fin qui previsto.

Il sistema H.A.C.C.P. costituisce lo strumento ideale per la corretta attuazione dell'autocontrollo.

Tuttavia, bisogna tener presente che la sua realizzazione non può prescindere dalla preliminare implementazione di procedure relative alle "buone pratiche di lavorazione", o GMT, ed alle pratiche di "sanificazione operative standard", o SSOP, che costituiscono dei prerequisiti per l' H.A.C.C.P.

L'H.A.C.C.P.(Hazard Analysis Critical Control Point)è un sistema preventivo di controllo degli alimenti, finalizzato a garantirne la sicurezza, basato sullo sviluppo di un documento scritto, il piano

H.A.C.C.P. , che elenca le procedure da seguire per assicurare il controllo di processo.

Il sistema H.A.C.C.P. è basato su sette tappe fondamentali:

- 1)**Analisi dei pericoli**: identificare i pericoli significativi di natura biologica, chimica o fisica associati alla produzione di un alimento in tutte le sue fasi, valutando la probabilità che si verifichino e predisponendo le misure preventive necessarie per il loro controllo;
- 2)**Punti critici di controllo CCP**: determinare i punti critici da controllare al fine di eliminare i pericoli o minimizzare la probabilità che si realizzino;
- 3)**Limite critico**: stabilire i limiti critici che devono essere rispettati per assicurare che i punti critici siano sotto controllo;
- 4)**Monitoraggio CCP**: stabilire un sistema di monitoraggio che garantisca il controllo dei punti critici tramite opportune procedure programmate;
- 5)**Azioni correttive**: stabilire l'azione correttiva da attuare quando il monitoraggio indica che i limiti critici sono stati superati;
- 6)**Verifica e validazione**: stabilire procedure supplementari per verificare che il sistema H.A.C.C.P. sta funzionando in maniera efficace;
- 7)**Registrazione dati**: stilare una documentazione riguardante tutte le procedure e la loro applicazione.

Per prerequisiti s'intende lo sviluppo, la realizzazione e la documentazione di programmi atti a controllare quei fattori che possono non essere in diretta relazione con i controlli ma che assicurano condizioni ambientali favorevoli alla produzione igienica degli alimenti. Tra i prerequisiti vanno annoverati le caratteristiche strutturali, funzionali ed igienico sanitarie degli stabilimenti, la manutenzione delle

attrezzature, il programma di controllo delle acque e degli infestanti che, nel complesso, costituiscono le GMP.

Inoltre, è necessario sviluppare, realizzare e mantenere delle procedure operative standard (SSOP) per la pulizia e la sanificazione delle superfici a contatto o che possono venire a contatto con gli alimenti prima e durante le operazioni di lavorazione, sufficienti a favorire la contaminazione diretta degli stessi.

❖ **Campo di applicazione della Decisione 2001/471/CE**

Ai sensi dell'articolo 1 della Decisione, l'H.A.C.C.P. deve essere applicato in tutti gli stabilimenti di seguito indicati:

- 1)Macelli autorizzati ai sensi degli articoli 5 e 13 del D.Lvo 286/94;
- 2)Macelli autorizzati ai sensi degli articoli 7 e 13 del D.P.R. 495/97;
- 3)Laboratori di sezionamento autorizzati ai sensi degli articoli 6 e 13 del D.Lvo 286/94 e ai sensi degli articoli 7 e 13 del D.P.R. 495/97;
- 4)Depositi frigoriferi autorizzati ai sensi dell'articolo 13 del D.Lvo 286/94 e ai sensi degli articoli 7 e 13 del D.P.R. 495/97;
- 5)Impianti di riconfezionamento autorizzati ai sensi dell'articolo 7 del D.P.R. 495/97.

Pertanto, nei suddetti stabilimenti, sarà applicato l'H.A.C.C.P. con la possibilità, per gli operatori, di avvalersi di appositi Manuali di Corretta Prassi stilati dalle Associazioni di categoria.

Per quanto riguarda i controlli microbiologici, previsti nell'articolo 10, paragrafo 2, della Direttiva 64/433/CEE, essi devono essere effettuati conformemente a quanto previsto nell'articolo 2 della Decisione 2001/471/CE.

Tale articolo dunque si applica esclusivamente ai macelli e laboratori di sezionamento autorizzati ai sensi degli articoli 5,6 e 13 del D.Lvo 286/94.

IL SISTEMA U.S.A.: “PATHOGEN REDUCTION: HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINT (H.A.C.C.P.) SYSTEMS FINAL RULE” (PR/H.A.C.C.P.)

Negli U.S.A. la pubblicazione del documento del FSIS-USDA “Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (H.A.C.C.P.) System final rule (PR/H.A.C.C.P.)”, nel luglio 1996, tracciava la strada per un’effettiva riduzione delle tossinfezioni alimentari da consumo di carne.

La finalità esplicita del “Pathogen Reduction” è la riduzione dei rischi di tossinfezioni alimentari associati al consumo di carni rosse e pollame.

Per raggiungere l’obiettivo, si prevede anche la possibilità di ricorrere ad un trattamento decontaminante delle carcasse al termine della linea di macellazione, operazione, questa, non consentita dalla legislazione comunitaria.

La Decisione comunitaria riprende alcuni contenuti fondamentali del progetto statunitense; quest'ultimo prevede che le imprese debbano:

- sviluppare, implementare ed applicare le cosiddette SSOP;
- implementare il sistema H.A.C.C.P. ;
- effettuare analisi microbiologiche per verificare l’adeguatezza della gestione del problema della prevenzione e rimozione della contaminazione fecale; per quanto riguarda i criteri microbiologici, negli USA si privilegiano i controlli sui patogeni.

Al di là delle analogie, si constata una fondamentale differenza tra il “Pathogen Reduction” e la Decisione comunitaria: la scelta di effettuare campionamenti per quantificare la Carica Batterica Totale e le

Enterobatteriacee mira alla verifica delle condizioni igieniche di lavorazione, mentre il provvedimento statunitense si pone come obiettivo essenziale la riduzione dei patogeni. Per questo motivo sono previsti campionamenti per la ricerca di Salmonella, scelta perché è un patogeno di rilevante importanza che può essere presente nelle carcasse di varie specie animali.

L'approccio statunitense appare organico e coerente, richiedendo:

- 1) L'applicazione di un prerequisito(SSOP);
- 2) L'applicazione di un controllo di processo (H.A.C.C.P.) a carattere preventivo;
- 3) La valutazione dell'efficacia di quanto messo in atto attraverso l'accertamento della riduzione dei patogeni (Salmonella).

Nel documento statunitense sembra emergere la necessità di rendere il meno traumatico possibile l'obbligo che implementare SSOP e H.A.C.C.P. negli impianti di macellazione.

Si è proposto pertanto un'applicazione progressiva: le SSOP sono state applicate entro l'anno 1997, mentre per l'implementazione dell'H.A.C.C.P. è stata stabilita una differenziazione sulla base delle dimensioni dell'impresa.

In ogni modo entro il 2000 sia le grandi che medie e piccole imprese sono andati a pieno regime e per il 2010 ci si è proposti la riduzione del 50% dei patogeni .

SCOPO DEL LAVORO

Scopo della ricerca è stato il monitoraggio microbiologico di carcasse di galline ovaiole, macellate in uno stabilimento in possesso di riconoscimento CEE, volto a raccogliere dati riguardanti percentuali e livelli di microrganismi indicatori d'igiene, così come previsto dalla Decisione Comunitaria per i bovini, i suini, gli ovini, i caprini e gli equini, nonché la ricerca di microrganismi patogeni come contemplato dal provvedimento statunitense che pone come obiettivo essenziale la riduzione di patogeni.

Questa condotta permette di ottenere un quadro completo della situazione monitorata.

MATERIALI E METODI

In un macello avicolo, riconosciuto CEE, sono stati effettuati campionamenti per controlli batteriologici sia a carico delle carcasse, sia a carico delle superfici delle strutture.

Nello stabilimento in esame sono quotidianamente macellati circa 12000 capi per sei giorni la settimana; parte degli animali macellati è commercializzata come pollo sfilato, la restante parte è destinata al sezionamento e al confezionamento e conferita alla distribuzione.

❖ **Campionamento delle carcasse di galline ovaiole.**

La gallina ovaiole raggiunge la maturità sessuale a 150-160 giorni di vita (fase di pollastra). Questa età può tuttavia variare anche di molto secondo il ceppo genetico. Il ciclo produttivo (fase di gallina ovaiole) è di 10-12 mesi ed oltre.

L'allevamento avviene prevalentemente in batteria poiché assicura un efficace controllo della produzione, rispetto all'allevamento a terra.

I ceppi attualmente allevati producono 300-310 uova l'anno, con un peso medio di circa 60-62g (19 Kg d'uova) e con un consumo di 2-2,1 Kg di mangime per Kg d'uova prodotte.

Per ottimizzare le produzioni lo stato sanitario deve risultare soddisfacente con un ambiente ed un microclima particolarmente controllati.

Al termine del ciclo, quando la produzione scende al di sotto del 60-65%, le galline sono avviate in stabilimenti autorizzati e specializzati nella macellazione e commercializzazione.

Il peso medio vivo alla macellazione varia da 1,8 a 2,1 Kg in relazione al ceppo genetico che le differenzia in galline leggere e medio

leggere. Ambedue queste categorie sono state oggetto della nostra indagine.

❖ **Campionamento delle carcasse di galline ovaiole.**

Sono stati esaminati n.95 carcasse galline ovaiole.

Metodo di campionamento

E' stato prescelto il metodo non distruttivo, e sono stati pertanto utilizzati tamponi sterili, inumiditi, prima dell'uso, in una soluzione acquosa sterile contenente lo 0.1% di peptone e lo 0.85% di NaCl.

Il tampone, inumidito per almeno 5 secondi nel diluente, è stato strofinato inizialmente in senso verticale, poi orizzontale e quindi in diagonale, per non meno di 20 secondi, sull'intera superficie dei diversi siti della carcassa, delineata da uno stampo sterile, esercitando la maggiore pressione possibile.

Successivamente all'operazione con tampone inumidito, la procedura di campionamento è stata ripetuta con tampone asciutto.

Punti di campionamento

Per ciascuna carcassa sono stati effettuati due prelievi uno sulla superficie esterna a livello del dorso (con stampo delimitante un'area di 100 cm^2) ed uno sulla superficie interna all'altezza dei reni (con stampo delimitante un'area di 12 cm^2).

Procedura di campionamento e numero di campioni prelevati

La ricerca è stata condotta nel 2003, da febbraio a dicembre, e nel 2004, da gennaio a marzo, effettuando per ognuno di questi mesi, nel corso di una stessa giornata campionamenti a carico di 5 carcasse.

Il prelievo dei campioni è stato sempre fatto a metà del giorno di lavorazione, prima della procedura di raffreddamento.

Complessivamente sono stati effettuati 190 prelievi di cui 95 superficiali e 95 interni.

Metodo microbiologico per l'esame dei campioni

I tamponi, dopo il prelievo, sono stati posti in acqua peptonata tamponata, tenuti a +4°C durante il trasporto ed esaminati subito dopo l'arrivo in laboratorio.

La sospensione del tampone è stata agitata vigorosamente e poi utilizzata per l'allestimento delle diluizioni decimali.

I microrganismi ricercati sono stati i seguenti:

- 1) Carica batterica totale;
- 2) Coliformi totali;
- 3) E.coli;
- 4) Stafilococchi potenzialmente patogeni;
- 5) Salmonella spp;
- 6) Listeria spp.

❖Campionamento batteriologico per controlli di pulizia e disinfezione del macello

Il campionamento batteriologico delle superfici è stato eseguito prima dell'inizio della macellazione, su superfici che erano state deterse e sanificate.

Metodo di campionamento

Sono stati fatti tamponi sulle superfici (100 cm²), utilizzando la stessa metodica usata per i tamponi effettuati sulle carcasse.

Frequenza

I campioni sono stati prelevati per 12 mesi per un totale di 24 prelievi.

Luoghi di campionamento

Per il campionamento sono state scelte le seguenti superfici:

- 1) Paletta evisceratrice;
- 2) Tappeto rotante del tavolo sito alla fine della catena di macellazione.

Trasporto

I tamponi prelevati sono stati mantenuti a 4°C durante il trasporto.

Procedure batteriologiche

Si è proceduto, per i tamponi ambientali, alla ricerca dei seguenti microrganismi:

- 1) Carica batterica totale;
- 2) Coliformi totali;
- 3) E.coli;
- 4) Stafilococchi potenzialmente patogeni;
- 5) Salmonella;

Le metodiche e i terreni utilizzati sono di seguito elencati:

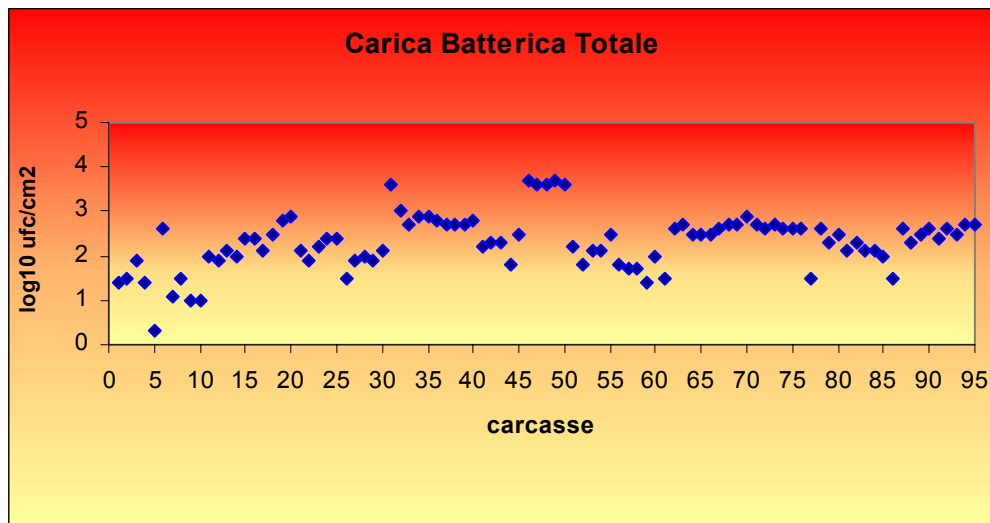
- Carica batterica totale: PCA (Plate Count Agar) a 37°C per 24-48 ore;
- Coliformi totali: VBA (Brillant Green Agar) a 37°C per 24-48 ore;
- Stafilococchi potenzialmente patogeni : BP (Baird Parker) a 37°C per 48 ore;

- Salmonella: acqua peptonata a 37°C per 16-18 ore, Brodo Selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth modificato a 43°C per 24-48 ore, Hektoen enteric agar e Rambach agar a 37°C per 24 ore e successiva sierotipizzazione.
- Listeria: LEBB+UVM 1 a 30°C per 24 ore, semina della brodo cultura 1 in LEBB+ UVM 2 a 30°C per 24 ore, isolamento della brodo cultura 2, previa diluizione e non in KOH, sul Palcam medium incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizione di microaerofilia + Api Listeria.

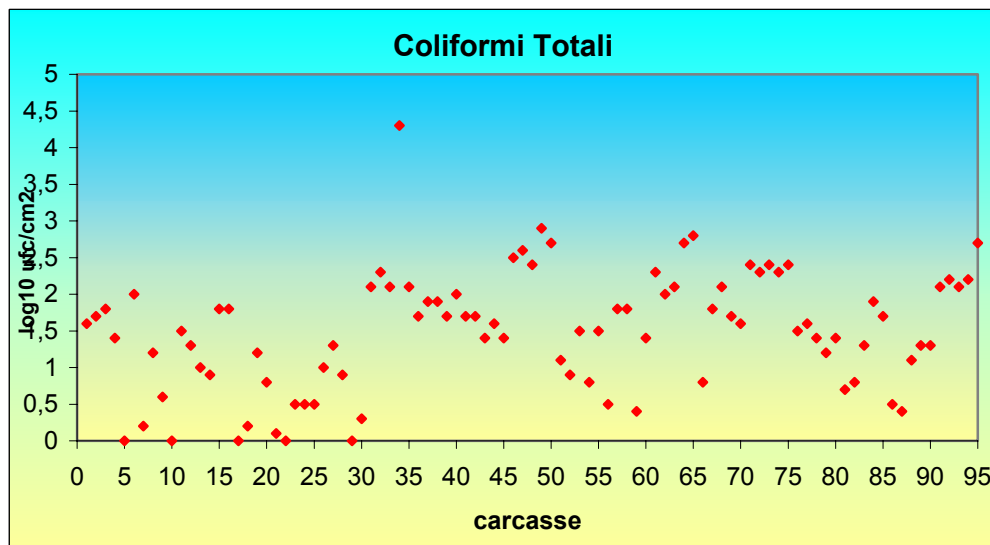
RISULTATI

❖ TAMPONI SUPERFICIALI DELLE CARCASSE

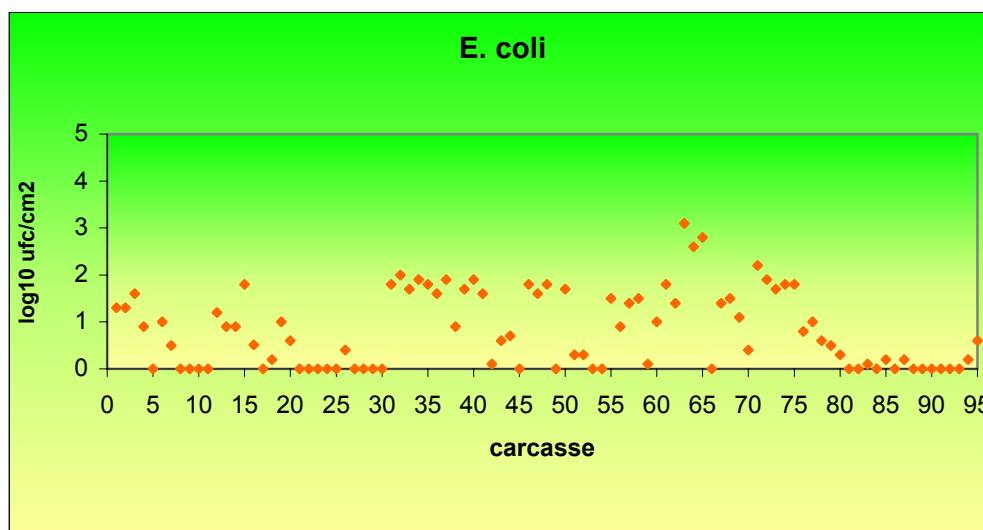
In tutti i campioni la Carica Batterica Totale è risultata compresa tra $\log_{10} 0,3$ a $\log_{10} 3,7$ ufc/cm² con riscontri più frequenti tra $\log_{10} 2$ a $\log_{10} 3$ ufc/cm².



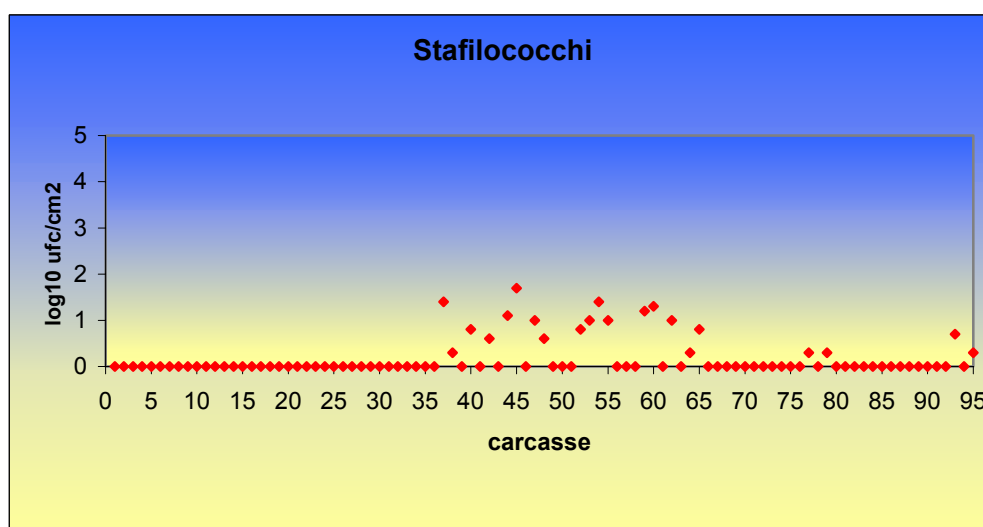
I coliformi totali, assenti in quattro campioni, erano presenti in concentrazioni oscillanti tra $\log_{10} 0,1$ e $\log_{10} 4,3$ ufc/cm², più spesso tra $\log_{10} 1,1$ e $\log_{10} 2$ ufc/cm².



E. coli è risultata assente in 30 campioni; negli esemplari positivi i valori si sono attestati tra $\log_{10} 0,1$ e $\log_{10} 3,1$ ufc/cm², con maggiore incidenza tra $\log_{10} 1$ e $\log_{10} 2$ ufc/cm².



Gli stafilococchi potenzialmente patogeni non sono stati rilevati nel 78% dei campioni. Nel 22% degli esemplari il loro numero si è presentato nell'intervallo di $\log_{10} 0,3$ e $\log_{10} 1,7$ ufc/cm², attestandosi nella maggior parte dei casi a $\log_{10} 1$ ufc/cm².



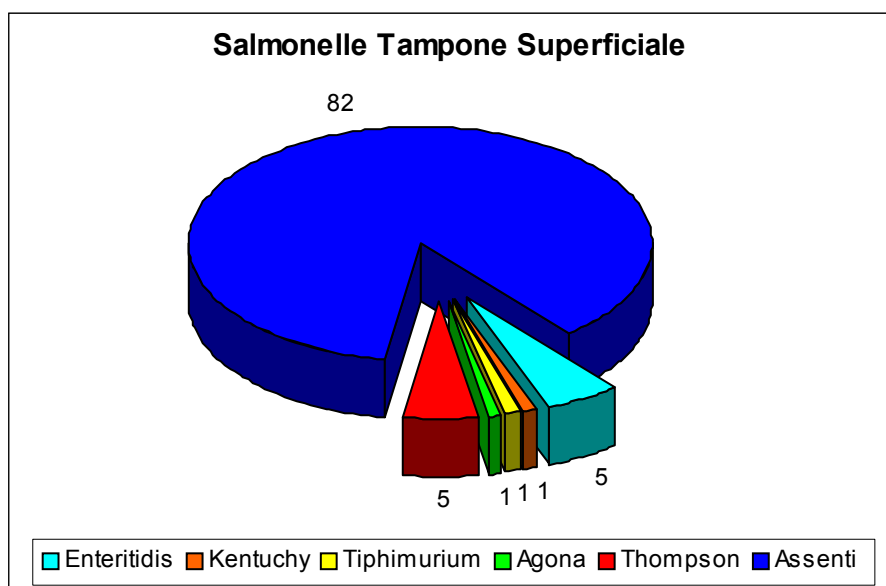
Listeria monocytogenes è stata isolata in 1 campione.

Salmonella spp. è stata rinvenuta nell'13,6% dei campioni.

La tabella n. 1 evidenzia i sierotipi e la frequenza d'isolamento degli stessi.

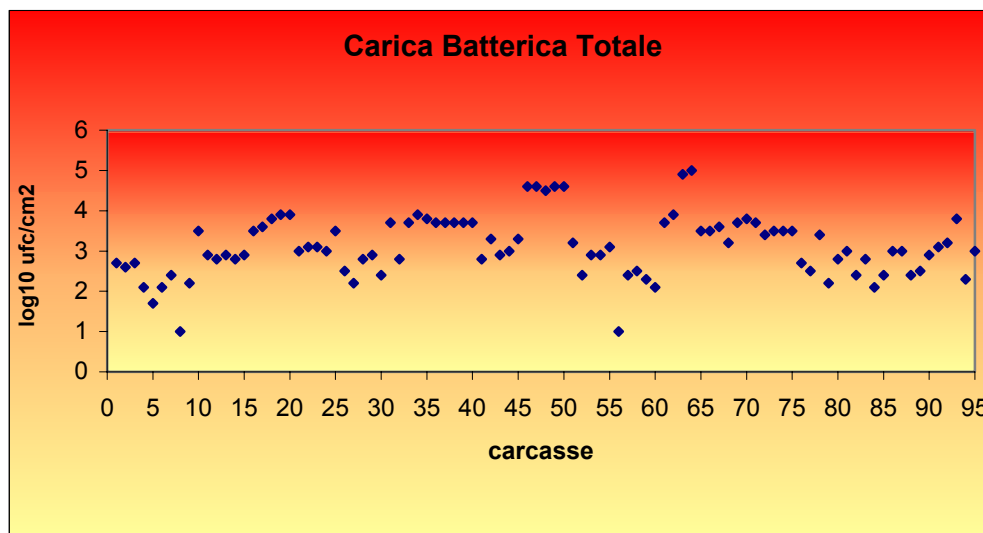
Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole	
SPECIE	numero isolati
S. enteritidis	5
S. thompson	5
S. kentucky	1
S. agona	1
S. typhimurium	1
TOTALE	13

Tabella 1

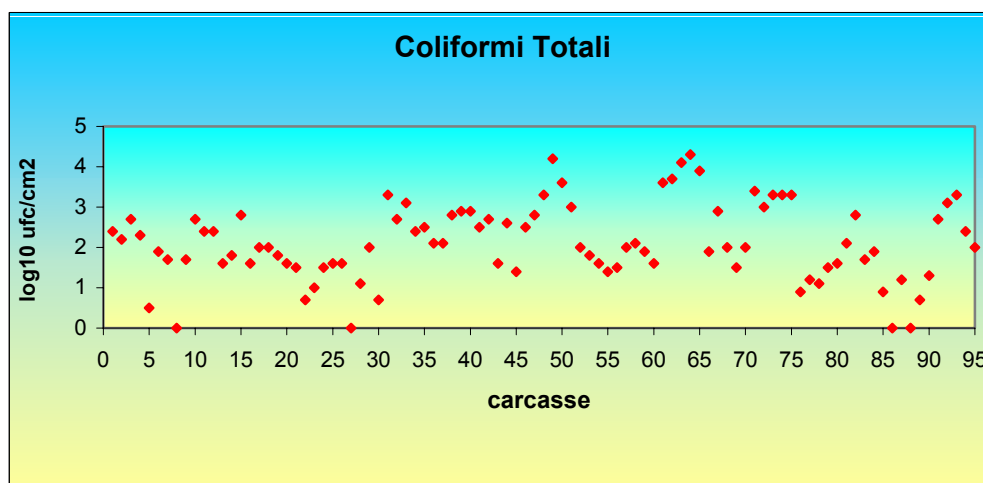


❖ TAMPONI INTERNI DELLE CARCASSE

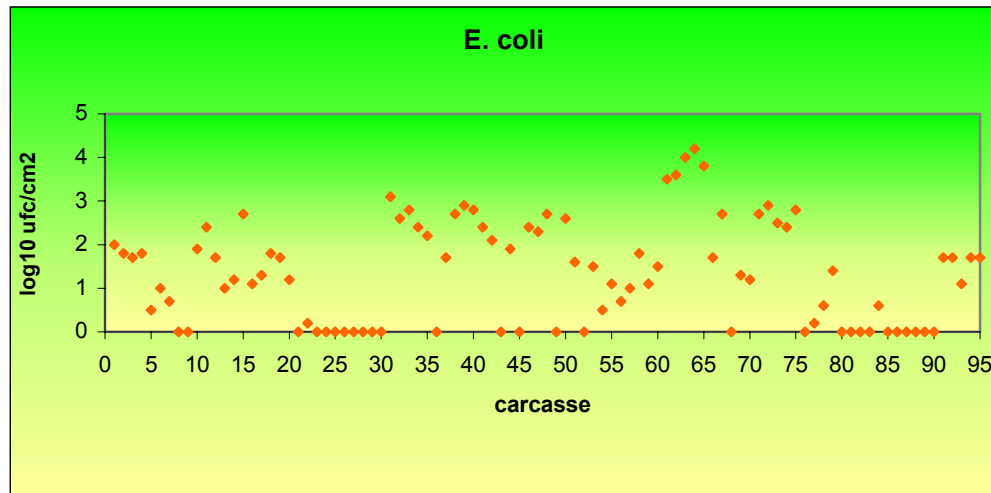
La concentrazione della Carica Batterica Totale è risultata compresa tra $\log_{10} 1$ e $\log_{10} 5$ ufc/cm², l'intervallo osservato più frequentemente è stato tra $\log_{10} 2,1$ e $\log_{10} 3$ ufc/cm².



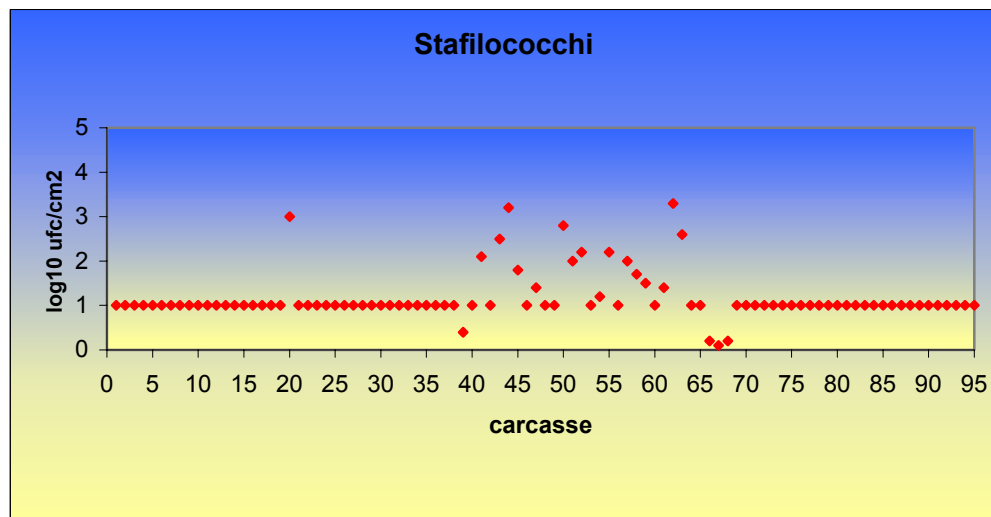
I coliformi totali, assenti in quattro campioni, sono stati evidenziati nel range compreso tra $\log_{10} 0,5$ e $\log_{10} 4,3$ ufc/cm², più spesso tra $\log_{10} 1,1$ e $\log_{10} 2$ ufc/cm².



E. coli, assente in 28 campioni, ha presentato nei restanti campioni valori compresi tra $\log_{10} 0,2$ e $\log_{10} 4,2$ ufc/cm² con maggiori riscontri tra $\log_{10} 1$ e $\log_{10} 2$ ufc/cm².



Per gli stafilococchi potenzialmente patogeni i valori hanno oscillato da $\log_{10} 0,1$ e $\log_{10} 3,3$ ufc/cm² attestandosi di più a $\log_{10} 1$ ufc/cm².



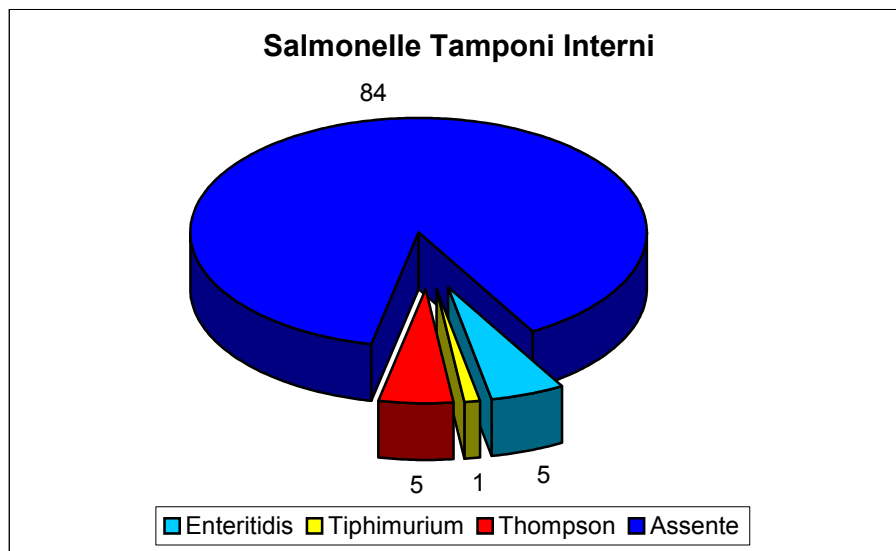
Listeria monocytogenes è stata isolata in 1 campione.

Salmonella spp. è stata rinvenuta nell'11,5% dei campioni.

La tabella n. 2 evidenzia i sierotipi e la frequenza d'isolamento degli stessi.

Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole	
SPECIE	numero isolati
S. enteritidis	5
S. thompson	5
S. typhimurium	1
TOTALE	11

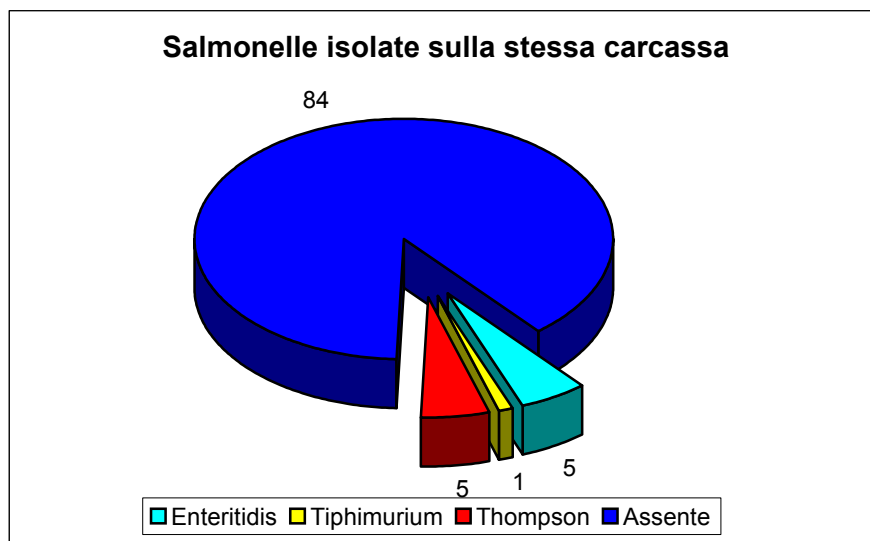
Tabella n. 2



Su n. 11 carcasse di galline ovaiole, Salmonella spp è stata isolata con entrambi i prelievi presentando identici sierotipi (Tabella n.3)

Salmonelle spp. isolate dalle stesse carcasse avicole mediante tampone superficiale e tampone interno	
SIEROTIPI	Numero di isolamento
S. enteritidis	5
S. thompson	5
S. typhimurium	1
TOTALE	11

Tabella n .3



❖ CONFRONTO TRA CAMPIONAMENTO INTERNO E SUPERFICIALE

I risultati relativi alla carica batterica totale tra il campionamento interno e superficiale è riportato nel grafico n.1

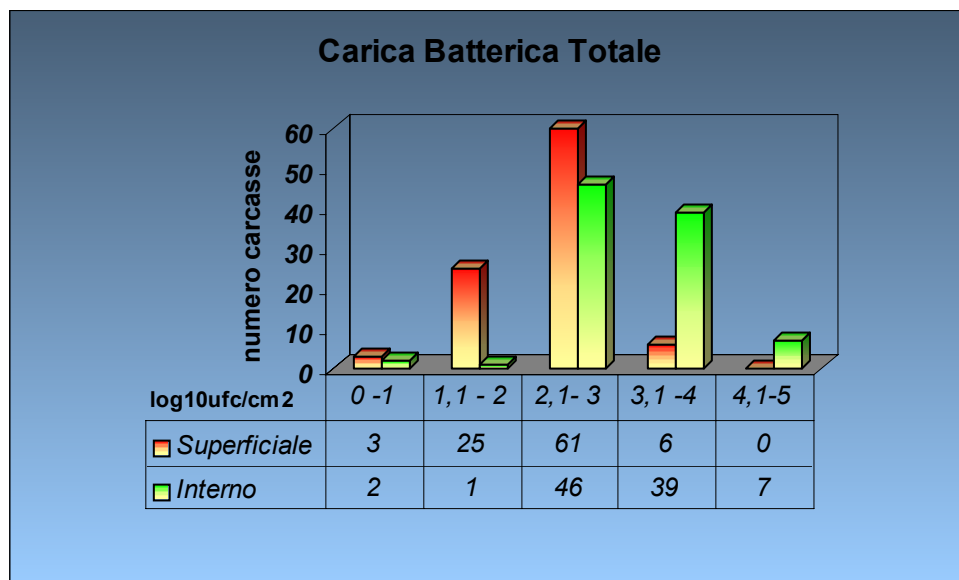


Grafico n.1

I coliformi totali sono invece riportati nel grafico n.2

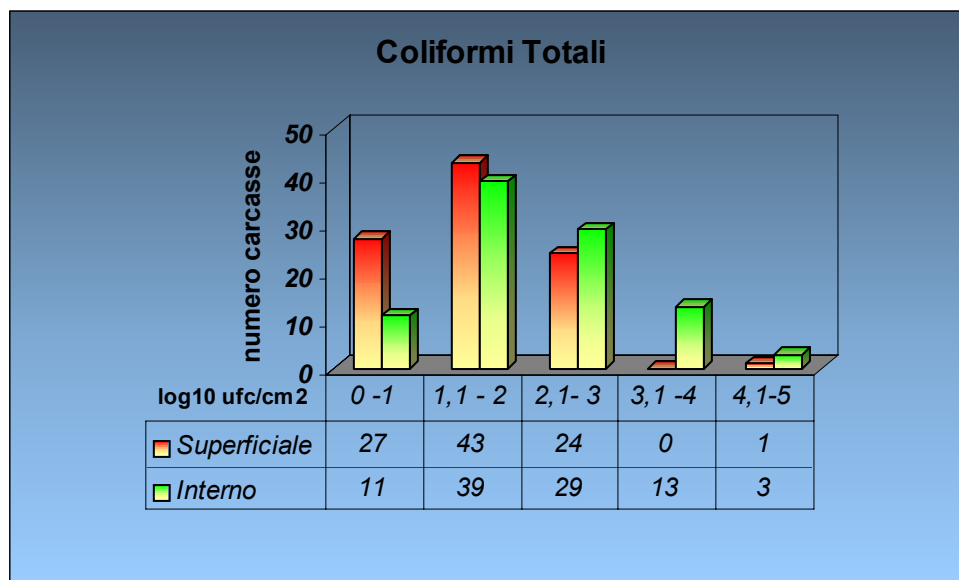
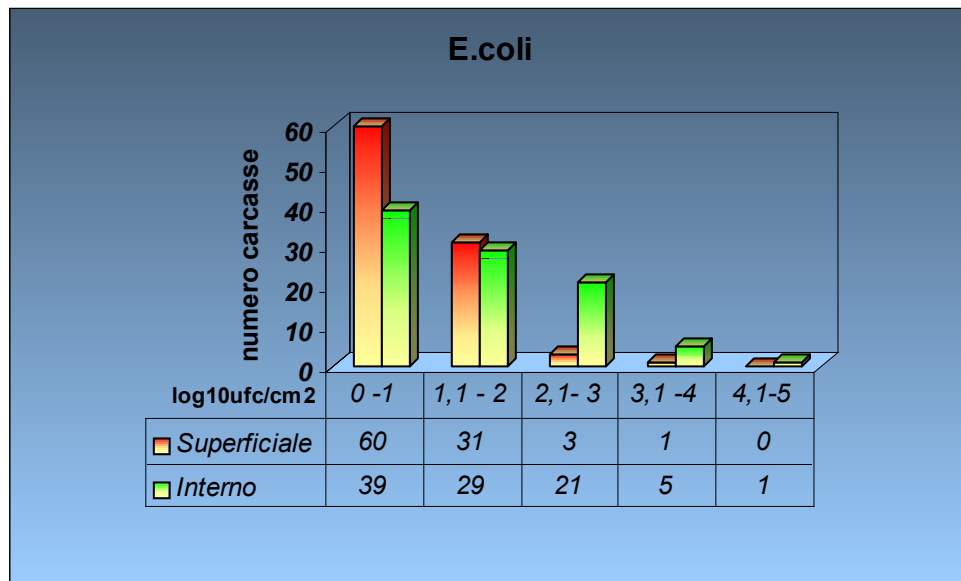


Grafico n.2

L'E.coli nel grafico n.3



Graficon.3

Gli stafilococchi potenzialmente patogeni invece nel grafico.4

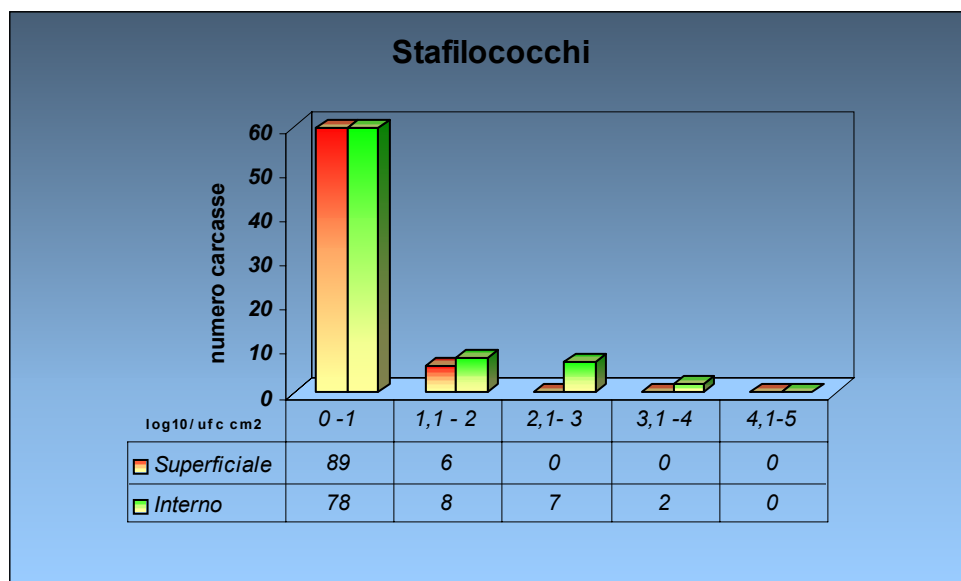
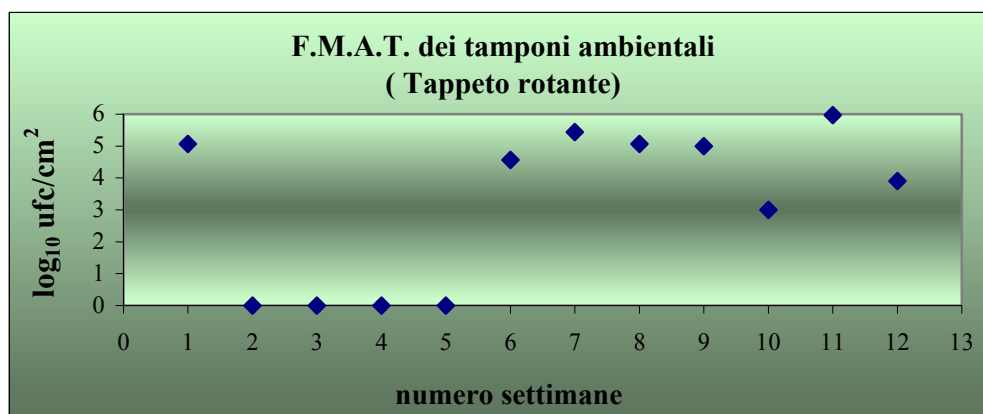
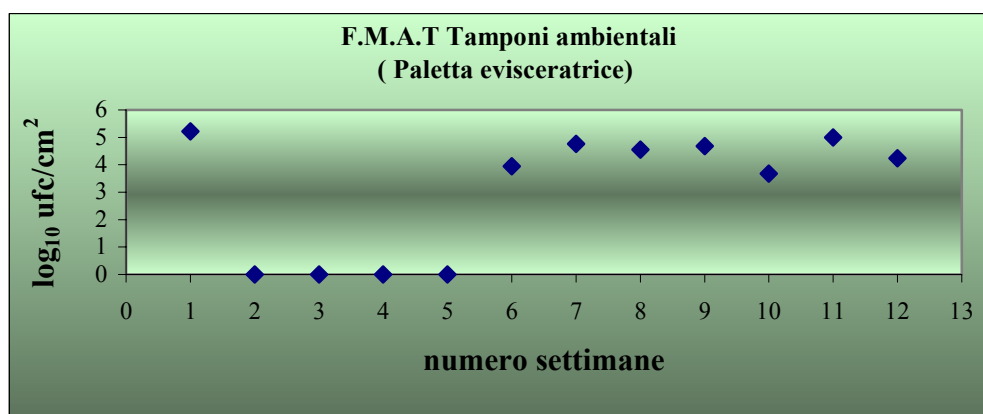


Grafico n.4

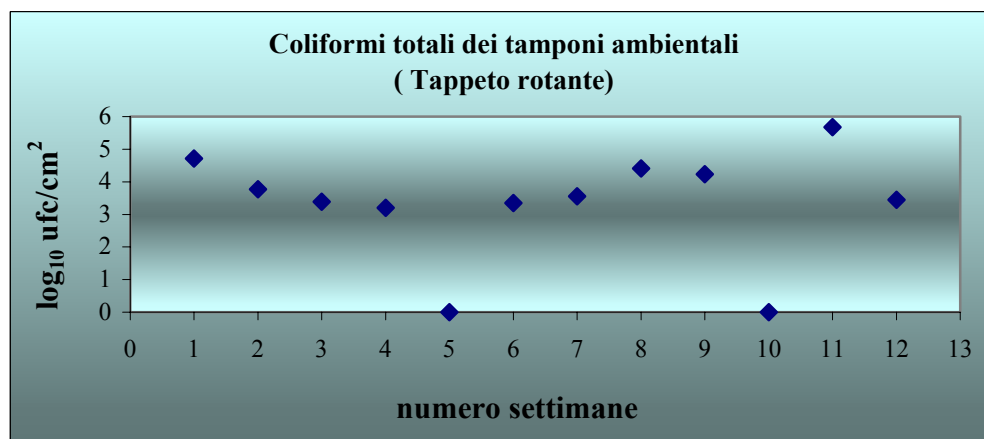
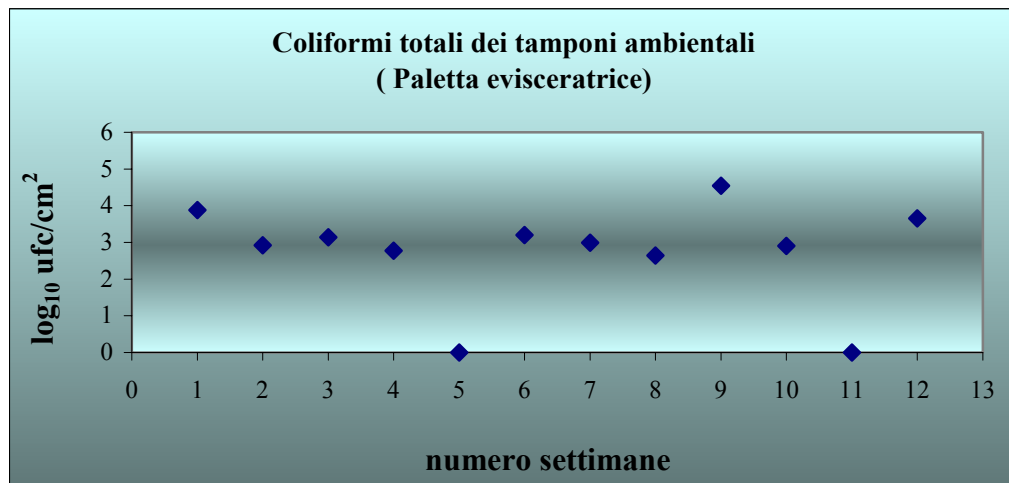
❖ TAMPONI AMBIENTALI

Il campionamento batteriologico delle superfici, eseguito su due superfici per un totale complessivo di 24 campioni, ha dato i seguenti risultati:

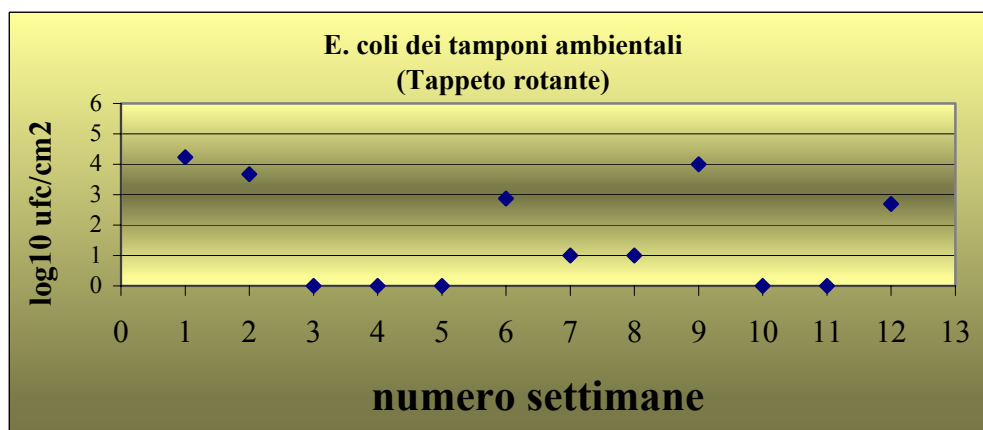
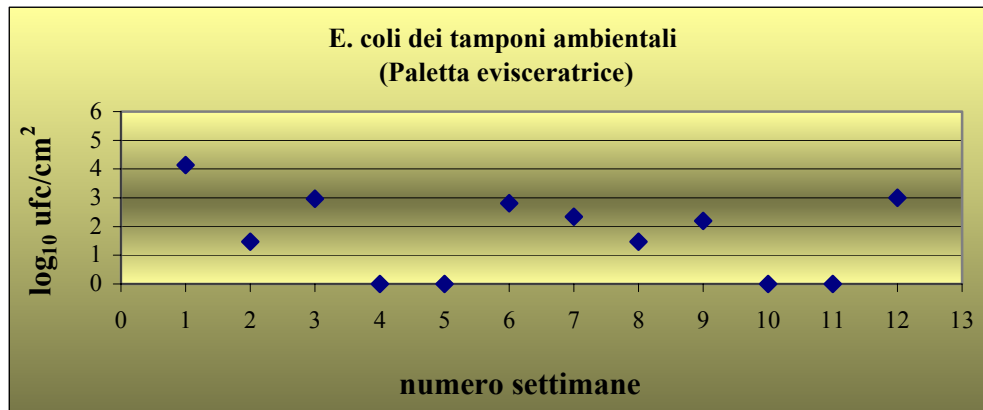
- La carica batterica totale, assente in 8 superfici, ha presentato nelle rimanenti, livelli compresi tra $\log 3$ e $\log 5$.



- I coliformi totali assenti in quattro superfici, nelle rimanenti hanno mostrato valori compresi tra \log_2 e \log_4 a carico della paletta evisceratrici e tra \log_3 e \log_4 a carico del tavolo rotante.



- E. coli non evidenziata in 9 superfici, laddove presente ha oscillato nel range di log1 e log4 .



- Stafilococchi potenzialmente patogeni non sono mai stati rinvenuti.
- Salmonella spp. è stata isolata da un tampone effettuato sul tappeto rotante. Il sierotipo risultato è stato S. Kentucky.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati della nostra indagine evidenziano che, relativamente ai microrganismi indicatori di igiene, la facies microbica delle carcasse prima della fase di refrigerazione è nella maggior parte dei casi ottimale.

La legislazione vigente non fa riferimento a parametri microbiologici relativi alle carcasse avicole, in verità emerge la necessità di suggerire delle linee guida, a carattere consultivo, il cui obiettivo principale deve essere quello di guidare, sia i produttori, sia gli addetti ai controlli ufficiali, nella valutazione delle condizioni microbiologiche durante la macellazione, nonché nella scelta delle eventuali misure correttive da prendere. Considerando che in futuro sicuramente anche per le strutture autorizzate con D.P.R 495/97 sarà prevista l'adozione delle stesse misure previste per gli stabilimenti autorizzati con D.Lvo 286/94, riteniamo opportuno proporre la seguente tabella.

Tabella 1

	Serie accettabile	Serie marginale	Serie inaccettabile
Carica batterica totale	<3,5	3,5- 5	>5
E. coli	< 1,5	1,5- 2,5	> 2,5

N.B: I valori riportati sono espressi come unità logaritmiche

Rispetto a quanto riportato in letteratura (Rosa Capita, 2004; Izat 1989), i livelli di carica batterica totali, coliformi ed E. coli rinvenuti da i nostri campioni sono stati costantemente più contenuti, probabilmente ciò è da ascriversi anche ai momenti dell'effettuazione dei campionamenti che nella maggior parte dei casi viene eseguito dopo la refrigerazione.

Anche la percentuale di isolamento di *Salmonella* spp, da noi riportata, è meno elevata rispetto ai dati bibliografici, (Jorsen; EC Okolocha. et al).

Le specie maggiormente presenti sono stati *Salmonella* Thiphimurium e *Salmonella* Enteritidis, ciò conferma che entrambe sono i sierotipi più diffusi nelle carni avicole.

Listeria monocytogenes è stata isolata solo in 1 campione.

Per quanto riguarda la verifica delle modalità di controllo della pulizia e della disinfezione delle superfici la Decisione 2001/471/CE consente di inserire i dati ottenuti in due categorie:

- 1) Accettabile
- 2) Inaccettabile

Tabella 1 : valori medi per numero di colonie per il test delle superfici

	Serie accettabile	INACCETTABILE
Carica batterica totale	0-10/cm ²	>10/ cm ²
Enterobatteriacee	0-1/cm ²	>1/cm ²

I risultati microbiologici delle superfici da noi ottenuti sono in qualche caso inaccettabili, per quanto è raffrontabile, rispetto alla Decisione. In realtà la contaminazione è risultata alcune volte elevata per i valori dei germi indicatori e indici d'igiene, ma è da evidenziare anche l'isolamento di *S. Kentucky*.

Consci che esiste una correlazione tra le condizioni igienico sanitarie dell'ambiente di produzione ed il rischio d'inquinamento degli alimenti, si ritiene che nell'impianto di macellazione, dove è stata condotta la ricerca, deve essere accurata la gestione delle operazioni di sanificazione.

3) RAFFRONTO TRA METODO DISTRUTTIVO E NON PER LE ANALISI MICROBIOLOGICHE SU CARCASSE AVICOLE

❖ L'attaccamento di batteri sulla superficie della carne

Il meccanismo di attacco dei batteri si realizza generalmente in due fasi.

La prima fase è caratterizzata dalla formazione di un film liquido sulla superficie della pelle o della carne che trattiene i batteri.

L'adesione, che a questo stadio è reversibile, si associa ad una interazione tra le cariche elettriche e l'idrofobicità della superficie del supporto o delle cellule.

Quando i batteri sono ≥ 50 nm sulla superficie, solo le forze di Van Der Waals sono coinvolte e le interazioni specifiche sono di fatto escluse, mentre nell'intervallo tra 10 a 20 nm, intervengono le interazioni elettrostatiche.

L'adesione è dovuta anche alle interazioni di appendici esterne (flagelli, frangiati, polisaccaridi extracellulari) delle cellule microbiche con recettori specifici di superficie.

La seconda fase, invece, si caratterizza per la formazione da parte dei batteri di esopolimeri (glicocalice) ed è irreversibile.

I polimeri extracellulari forniscono un ambiente favorevole per la crescita e il successivo attaccamento di più batteri, favorendo così la proliferazione di biofilms sotto condizioni sicure.

L'attaccamento irreversibile delle cellule alla superficie si realizza tra i 30 minuti e poche ore.

Diversi fattori come il pH, il tempo, la temperatura, l'ambiente, la specie batterica, la natura della superficie di contatto, la densità cellulare e l'osmolarità potrebbero influenzare l'attaccamento dei batteri alla superficie della carne.

Durante la sterilizzazione della carne contaminata, il rapporto dei batteri legati irreversibilmente su quelli legati reversibilmente inizialmente aumenta e poi diminuisce.

❖ Metodi di campionamento microbiologico della superficie di carcasse

Molte tecniche sono state sviluppate per ottenere una stima dei microrganismi sulla superficie della carne delle carcasse di pollo.

Il metodo distruttivo e quello del tampone hanno trovato la più ampia approvazione sia perché sono facili da utilizzare sia perché i dati sono generalmente più attendibili. Il metodo distruttivo viene considerato il metodo più accurato, mentre il non distruttivo è il più pratico.

La maggioranza degli studi indicano che il primo metodo (generalmente 2 mm di spessore nelle carcasse rosse o di pelle nelle carcasse di pollo) è più efficace tra i metodi di campionamento delle carcasse perché fornisce dati più reali e meno variabili permettendo il recupero quasi completo dei batteri.

Tuttavia, il metodo distruttivo è spesso non praticabile né accettabile sia dal punto di vista economico perché costoso sia per la natura invasiva e distruttiva della stessa procedura.

Per questo motivo le tecniche non distruttive sono generalmente usate nei Paesi dell'Unione Europea per raccogliere dati dalle superfici delle carcasse.

E' importante quindi ricordare che nelle linee guida applicative alla Decisione, elaborate dalla Direzione Generale della Sanità Pubblica Veterinaria Alimenti e Nutrizione- ufficio VIII, è specificato che il campionamento a tampone toglie solo una percentuale, circa il 20% , della flora complessiva presente sulla superficie della carne, per cui rappresenta solo un indicatore dell'igiene della superficie.

Se vengono utilizzati metodi diversi dal metodo distruttivo i criteri di resa microbiologici vanno stabiliti individualmente per ciascun metodo applicativo per poter essere collegati al metodo distruttivo e successivamente vanno approvati dall'autorità competente.

Inoltre, considerato quanto sopra riportato, viene specificato che nel caso in cui i campioni vengano prelevati con metodo non distruttivo, in sede di prima applicazione del provvedimento, e in attesa che I.S.S e gli I.Z.S. verifichino i criteri di resa microbiologica per tale metodo di campionamento, i limiti di riferimento vengono stabiliti, in via sperimentale e per il primo anno di applicazione della Decisione, in un quinto dei valori riportati nella Tabella 1.

Al termine della fase di sperimentazione sarà inviata alla Commissione Europea una relazione ministeriale riguardante l'applicazione della sperimentazione e gli esiti ottenuti.

Da questo si desume che le prove microbiologiche standard usate per garantire le condizioni igieniche delle carcasse sono basate esclusivamente sui risultati di metodologie distruttive.

Il metodo con tampone è anche permesso ma solo quando è stata precedentemente trovata una correlazione tra le tecniche di scissione e

di strisciamento. Secondo diversi autori, lo strisciamento sarebbe accettabile solo se i batteri presenti nell'area di campionamento fossero recuperati e se la precisione è alta.

Tuttavia, la tecnica dello strisciamento è comunemente usata nella pratica senza precedente accertamento di relazioni tra i risultati di entrambi metodi distruttivi e metodi non distruttivi.

SCOPO DEL LAVORO

La conoscenza del relativo numero di batteri recuperati dai differenti metodi di campionamento usati è necessario per la valutazione esatta dei dati microbiologici ottenuti dalle differenti tecniche.

Nello stesso macello avicolo, riconosciuto CEE, dove abbiamo condotto la prima sperimentazione sono stati effettuati campionamenti per controlli batteriologici a carico delle carcasse avicole per valutare il recupero dei batteri sia con il metodo distruttivo sia con il metodo non distruttivo.

MATERIALI E METODI

❖ **Campionamento delle carcasse.**

Sono stati esaminati n.45 carcasse di broilers e n. 50 carcasse di galline ovaiole.

Metodo di campionamento

E' stato effettuato sia il metodo non distruttivo che il metodo distruttivo.

Per il metodo non distruttivo sono stati utilizzati tamponi sterili, inumiditi, prima dell'uso, in una soluzione acquosa sterile contenente lo 0.1% di peptone e lo 0.85% di NaCl.

Il tampone, inumidito per almeno 5 secondi nel diluente, è stato strofinato inizialmente in senso verticale, poi orizzontale e quindi in diagonale, per non meno di 20 secondi, su una superficie di 25 cm², delineata da uno stampo sterile, esercitando la maggiore pressione possibile.

Successivamente all'operazione con tampone inumidito, la procedura di campionamento è stata ripetuta con tampone asciutto.

Per il metodo distruttivo sono stati utilizzati stampi e bisturi sterili per l'asportazione di 25 cm² di cute. I campioni poi sono stati collocati in sacchetti sterili.

Punti di campionamento

Per ciascuna carcassa i due prelievi sono stati effettuati sulla superficie esterna a livello del dorso con stampo delimitante un'area di 25 + 25 cm²

Procedura di campionamento e numero di campioni prelevati

La ricerca è stata condotta nel 2003 da marzo a dicembre e nel 2004 da gennaio a settembre effettuando per ognuno di questi mesi, nel corso di una stessa giornata campionamenti a carico di 5 carcasse. Il totale delle carcasse esaminate è stato di 95.

Il prelievo dei campioni è stato sempre fatto a metà del giorno di lavorazione, prima della procedura di raffreddamento.

Complessivamente sono stati effettuati 190 prelievi di cui 95 con metodo non distruttivo e 95 con metodo distruttivo.

Metodo microbiologico per l'esame dei campioni

Sia i tamponi che i prelievi di cute sono stati mantenuti a +4°C durante il trasporto e all'arrivo in laboratorio, dopo l'allestimento delle diluizioni decimali, sono stati ricercati i microrganismi di seguito elencati:

- 1) Carica batterica totale;
- 2) Coliformi totali;
- 3) E.coli;
- 4) Stafilococchi potenzialmente patogeni;
- 5) Salmonella spp;
- 6) Listeria monocytogenes.

Le metodiche utilizzate sono state riportate nella sperimentazione precedente.

RISULTATI

Nel Grafico n.1 sono riportati i dati della Carica batterica totale riscontrati con il metodo distruttivo e non distruttivo; nella Tabella n.1 sono riportati la media, la deviazione standard, il coefficiente di correlazione.

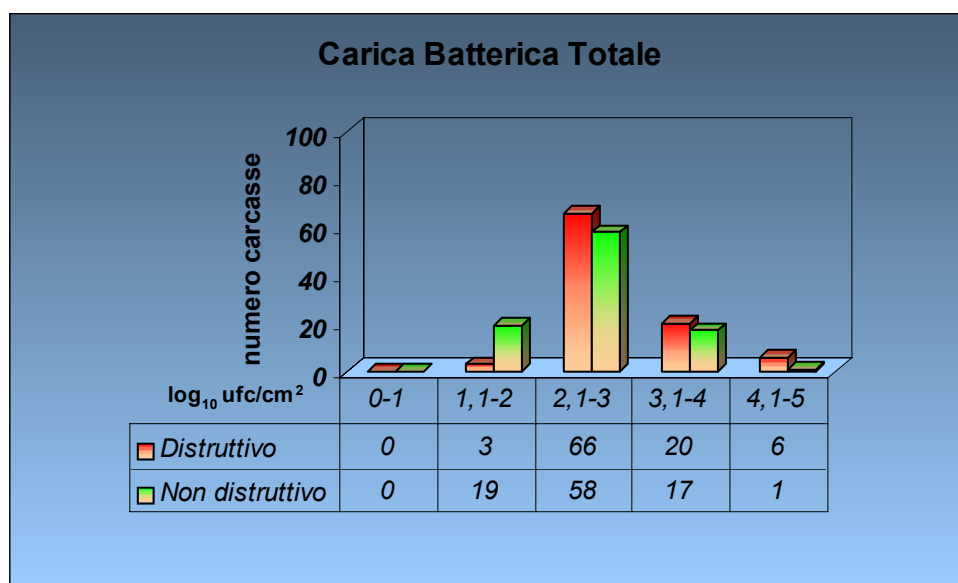


Grafico n.1

Tecniche di Campionamento	Media	Deviazione standard	Coefficiente di correlazione
Distruttivo	2,98	± 0,54	0,44
Non distruttivo	2,59	± 0,63	

Tabellan.1

I livelli dei coliformi totali, sono riportati nel Grafico n.2 e nella Tabella n.2 sono riportati i valori medi, la deviazione standard e il coefficiente di correlazione.

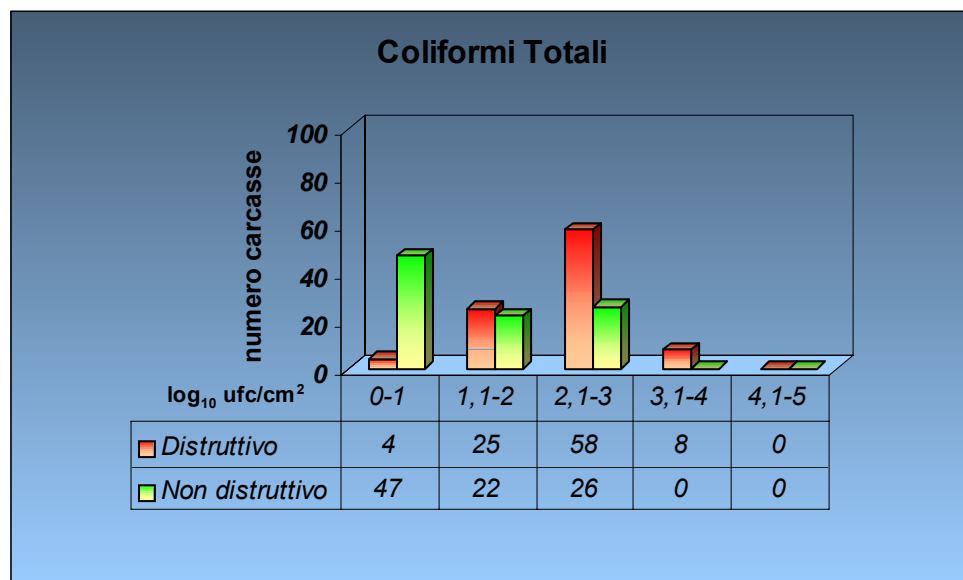


Grafico n.2

Tecniche di Campionamento	Media	Deviazione standard	Coefficiente di correlazione
Distruttivo	2,31	± 0,65	0,61
Non distruttivo	1,38	± 0,80	

Tabella n.2

I valori di E. coli, sono riportati nel Grafico n.3 e nella Tabella n.3 sono riportati i valori medi, la deviazione standard e il coefficiente di correlazione.

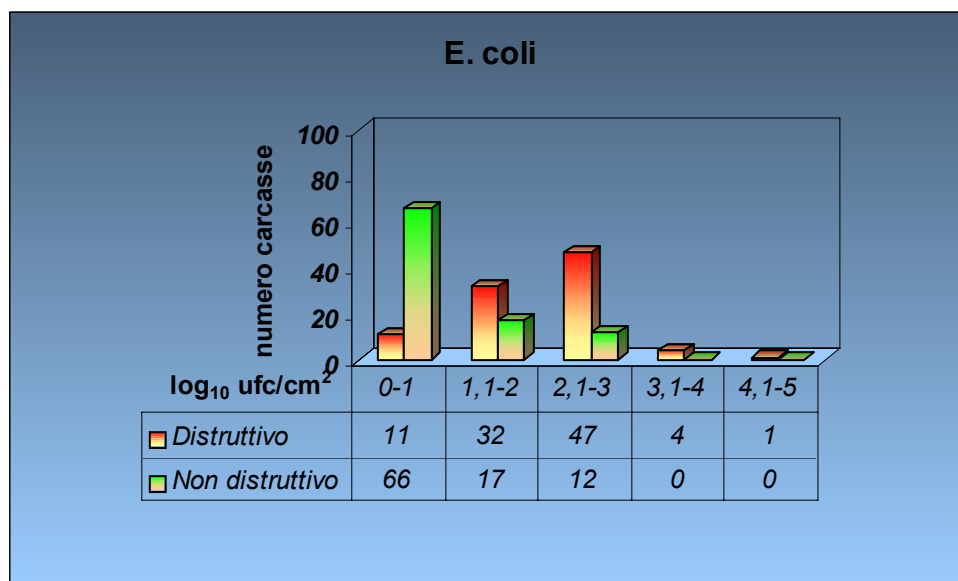


Grafico n.3

Tecniche di Campionamento	Media	Deviazione standard	Coefficiente di correlazione
Distruttivo	2,09	± 0,80	0,47
Non distruttivo	1,06	± 0,75	

Tabella n.3

I dati degli stafilococchi potenzialmente patogeni, sono riportati nel Grafico n.4 e nella Tabella n.4 sono riportati i valori medi, la deviazione standard e il coefficiente di correlazione.

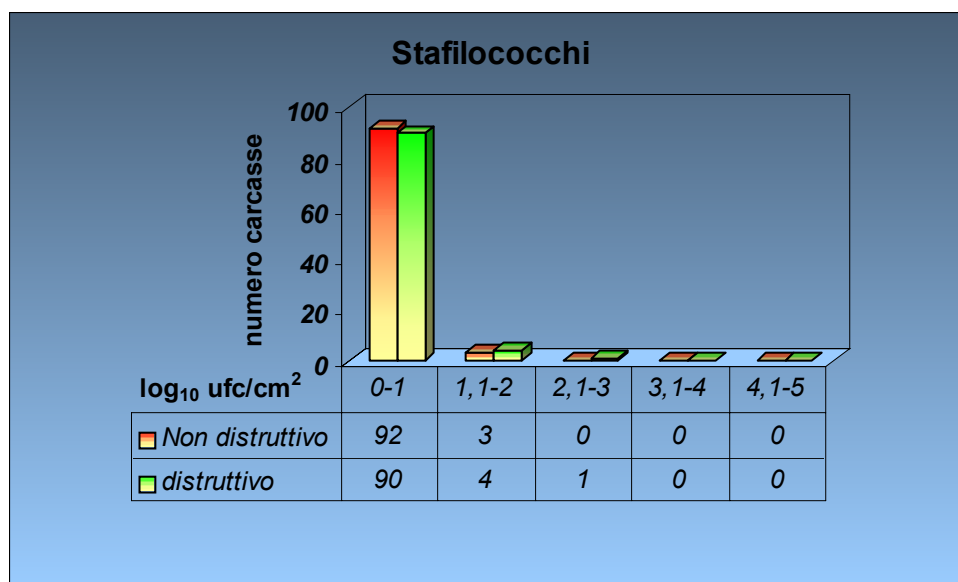


Grafico n.4

Tecniche di Campionamento	Media	Deviazione standard	Coefficiente di correlazione
Distruttivo	0,72	± 0,26	0,21
Non distruttivo	0,70	± 0,21	

Tabella n.4

I criteri di resa tra metodo distruttivo e metodo non distruttivo sono stati rispettivamente del 12% in più per la Carica batterica totale, 40% in più per i Coliformi totali e 46% in più per E. coli.

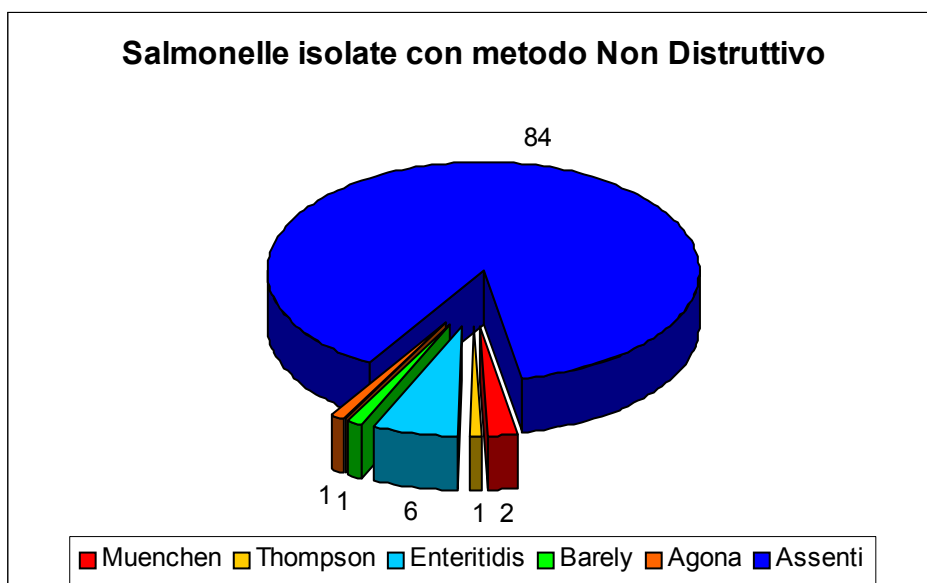
Listeria monocytogenes non è stata mai isolata.

Salmonella spp. è stata rinvenuta nell'11,5 % dei campioni esaminati con metodo non distruttivo.

La tabella n. 4 evidenzia la frequenza d'isolamento e i sierotipi

Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole mediante metodo non distruttivo	
SIEROTIPI	numero di isolamenti
S. enteritidis	6
S. muenchen	2
S. thompson	1
S. agona	1
S. bareilly	1
TOTALE	11

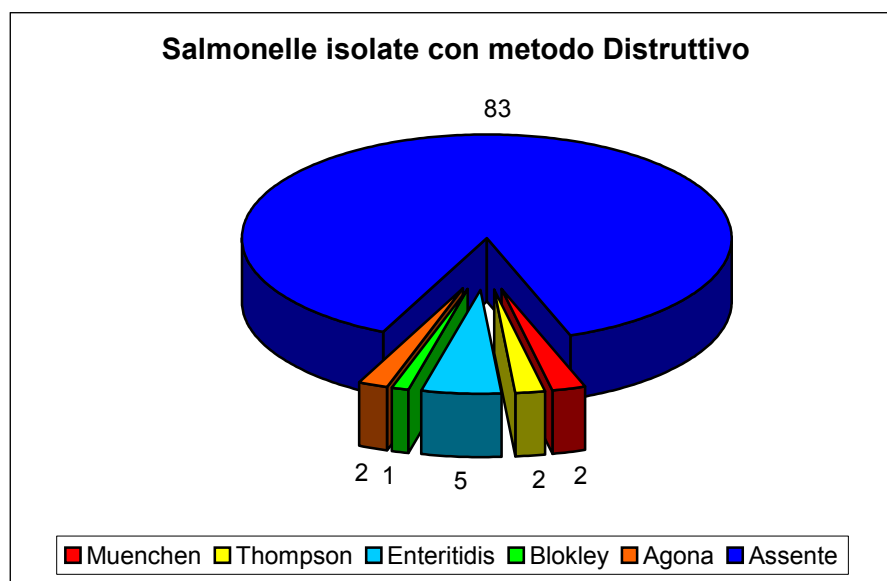
Tabella n.4



Con il metodo distruttivo, invece, Salmonella spp è stata rinvenuta nel 12,6% dei campioni e dalla Tabella n. 5 risulta la frequenza d'isolamento e i sierotipi degli stessi.

Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole mediante metodo distruttivo	
SIEROTIPI	Numero di isolamento
S. enteritidis	5
S. muenchen	2
S. thompson	2
S. agona	2
S. blockley	1
TOTALE	12

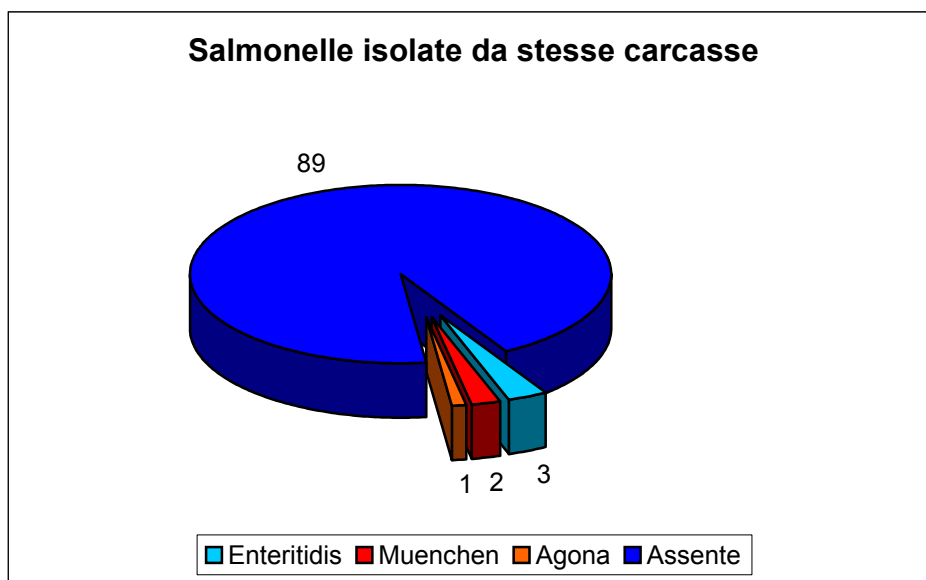
Tabella n.5



Su n. 6 carcasse di galline ovaiole, Salmonella spp è stata isolata con entrambi i metodi presentando identici sierotipi

Salmonelle spp. isolate dalle stesse carcasse avicole mediante metodo distruttivo e metodo non distruttivo	
SIEROTIPI	Numero di isolamento
S. enteritidis	3
S. muenchen	2
S. agona	1
TOTALE	6

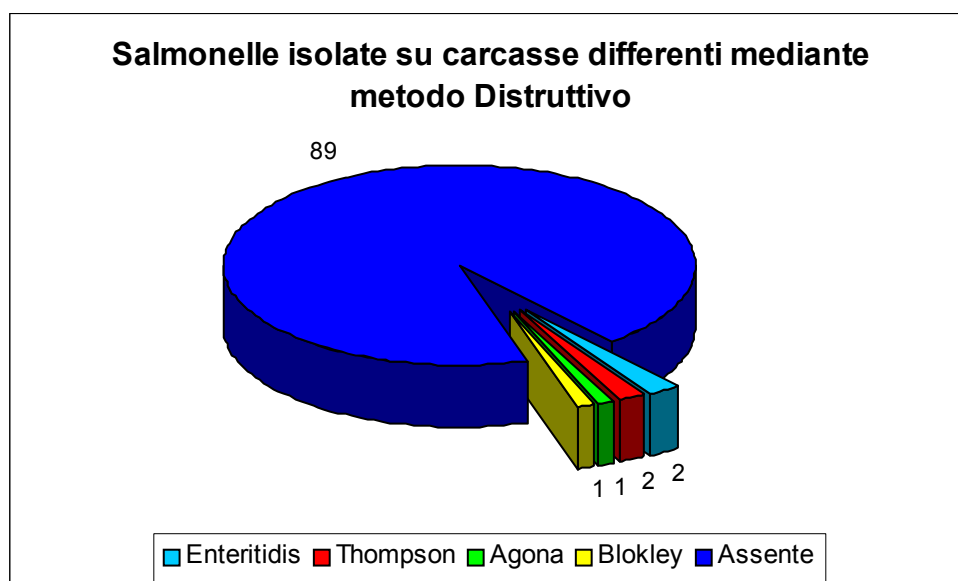
Tabella n.6



Il metodo distruttivo ha permesso di isolare Salmonella spp da altre 6 carcasse (n.1 gallina ovaiola, n.5 broilers) mentre il metodo non distruttivo ha evidenziato Salmonella spp da n.5 carcasse (n.4 gallina ovaiola, n1. broiler).

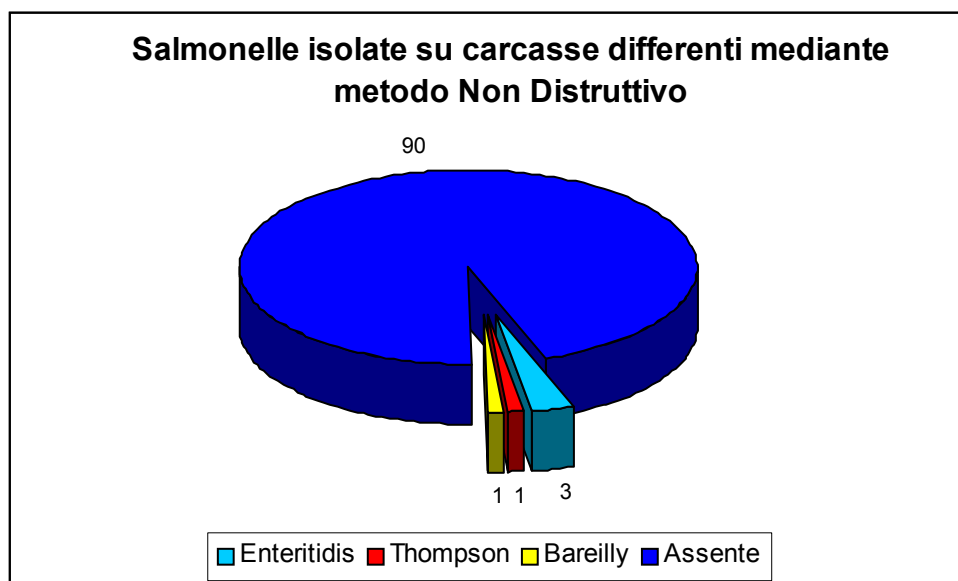
Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole differenti mediante metodo distruttivo		
SIEROTIPI	Numero di isolamento	Carcasse
S. enteritidis	2	Broiler
S. thompson	1	Gallina ovaiola
S. thompson	1	Broiler
S. agona	1	Broiler
S. blockley	1	Broiler
TOTALE	6	

Tabella n.7



Salmonelle spp. isolate da carcasse avicole differenti mediante metodo non distruttivo		
SIEROTIPI	Numero di isolamento	Carcasse
S.enteritidis	2	Gallina ovaiola
S.enteritidis	1	Broiler
S. thompson	1	Gallina ovaiola
S. bareilly	1	Gallina ovaiola
TOTALE	5	

Tabella n.7°



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nella sperimentazione precedente abbiamo elaborato la tabella guida per la valutazione delle condizioni microbiologiche delle carcasse avicole.

Tabella 1

	Serie accettabile	Serie marginale	Serie inaccettabile
Carica batterica totale	<3,5	3,5- 5	>5
E. coli	< 1,5	1,5- 2,5	> 2,5

N.B: I valori riportati sono espressi come unità logaritmiche

Confrontando i dati ottenuti dalle carcasse esaminate in questa sperimentazione, con quanto previsto dalla Tabella 1, per quanto riguarda la carica batterica totale con il metodo distruttivo, sono rientrati :

nella serie accettabile: 83,2 % delle carcasse

nella serie marginale: 16,8 % delle carcasse

nella serie inaccettabili nessuna carcassa

Per quanto ottiene all'E.coli, la situazione osservata è stata la seguente:

serie accettabile: 20 % delle carcasse

serie marginale: 48,4 % delle carcasse

nella serie inaccettabili: 31,6% delle carcasse.

Per quanto riguarda il metodo non distruttivo per la carica batterica totale , sono rientrati :

nella serie accettabile: 96,8 % delle carcasse

nella serie marginale: 3,2 % delle carcasse

nella serie inaccettabili nessuna carcassa

Per quanto ottiene all'E.coli, la situazione osservata è stata la seguente:

serie accettabile: 74,8% delle carcasse

serie marginale: 21 % delle carcasse

nella serie inaccettabili: 4,2 % delle carcasse

I criteri di resa tra metodo distruttivo e metodo non distruttivo sono stati rispettivamente del 12% in più per la Carica batterica totale, 40% in più per i Coliformi totali e 46% in più per E. coli.

Da rilevare che *Salmonella* spp è risultata positiva nel 12,6% di campioni con il metodo distruttivo e nell'11,5% con il metodo non distruttivo.

Concludendo possiamo affermare che il metodo non distruttivo recupera i batteri legati debolmente ma non rimuove i batteri saldamente, questo dipende a nostro avviso soprattutto dal tipo di microrganismo ed è evidente che i criteri di resa devono essere valutati preventivamente e attentamente per le varie specie animali al fine di stabilire la correlazione tra i metodi.

4) INATTIVAZIONE DI LISTERIA INNOCUA IN TRIPTIC SOY BROTH E CARNI TRITE DI POLLAME MEDIANTE LE ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE

È nota da tempo la presenza di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* in carni refrigerate o congelate di pollo e di altri animali da bassa corte nonché in prodotti a base di tali carni (Bersani e al 1991; Faccini e al 1991; Galli et al 1992; Ianieri et al. 1990; Barbuti et al 1990; Cantoni et al 1990; Paciniet al 1993; Anonymous 1990 a, b, c).

La contaminazione di tali carni deriva dalla presenza di *Listeria* nell'intestino, sulla pelle, nei mangimi, negli allevamenti e nei macelli (Cantoni et al.1989; Bailey et al 1990). Questi ultimi giocano un ruolo fondamentale nella diffusione del germe sulla carne. Infatti durante tutte le fasi di macellazione il mancato rispetto e controllo dei punti critici produce contaminazioni crociate e non di rado viene osservato che il numero delle carcasse contaminate a fine produzione risulta superiore a quello iniziale (Genigeorgis et al 1989, 1990). Le attrezzature e gli impianti di macellazione, nonché la tecnologia stessa possono favorire l'attecchimento del germe anche se raramente se ne verifica lo sviluppo. La contaminazione delle carcasse, soprattutto nel pollame, può essere dovuta anche alla presenza di animali con listeriosi in corso o portatori asintomatici di tale germe, poiché la listeriosi aviaria è diffusa nel mondo ed è nota fin dal 1932 (Gray, 1958). Dati della letteratura di diversa origine dimostrano che il 10-80% delle carcasse refrigerate o congelate del commercio di pollo, tacchino ed altre carni avicole, possono essere contaminate da *Listeria*. Stessa frequenza viene evidenziata in derivati di tali carni, in carni di tacchino o di pollo disossate o porzionate (ali, cosce, petti, dorelli, fegatini ecc..) (Anonymous 1989 b,c; Bailey et al

1989; Breer et al 1988; Genigeorgis et al 1990; Ryser et al 1991; Hatkin et al 1986; Vallavanti et al 1994).

In virtù di quanto detto la *Listeria monocytogenes* è considerato un microrganismo target da eliminare dalla catena alimentare.

Tale problema è sentito sia a livello Comunitario ma anche in U.S.A.. L'ultimo provvedimento Comunitario è infatti la Raccomandazione della Commissione del 1 Marzo 2005 che indica i programmi coordinati per i controlli ufffciali degli alimenti ; FSIS ha invece elaborato nell'ottobre 2004 le Compliance Guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products.

In queste linee Guida sono riportati alcuni studi sui vari trattamenti che possono determinare la distruzione di *Listeria* anche in combinazione con agenti antimicrobici. Tra i vari trattamenti considerati risultano la :

1. Pastorizzazione mediante vapore e acqua calda;
- 2 Pastorizzazione pre-confezionamento e post- confezionamento;
3. Alte Pressioni Idrostatiche;
4. Uso degli Agenti Antimicrobici.

ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE

Le Alte Pressioni Idrostatiche, applicate agli alimenti a scopo conservativo, è nota da tempo. Risalgono, infatti, al 1899 i primi esperimenti in campo alimentare dello statunitense Bert Hite, il quale riportò che pressioni di 450 MPa applicate al latte potevano garantire il mantenimento della sua qualità nel tempo e favorirne la conservabilità. Lo stesso Autore dimostrò, inoltre, che alcuni microrganismi, comprendenti lieviti e batteri lattici, risultavano più sensibili delle spore alle Alte Pressioni Idrostatiche. Agli inizi del '900 tali risultati non ricevettero, però, grande attenzione ragion per cui le ricerche di Hite non vennero più sviluppate.

Le apparecchiature dell'epoca non erano neanche in grado di reggere le pressioni elevate necessarie allo scopo, per cui l'uso del trattamento fu pressoché discontinuo. Grazie ai progressi dell'ingegneria registrati in questi ultimi anni e all'ottimizzazione di apparecchiature con materiali capaci di sostenere le Alte Pressioni Idrostatiche, le ricerche su questo tipo di trattamento degli alimenti si sono intensificate ed hanno riguardato vari alimenti.

I risultati delle applicazioni pratiche di tali studi hanno mostrato in molti casi la stabilità delle proprietà organolettiche e nutritive dell' alimento trattato e contemporaneamente la sua sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario.

Le Alte Pressioni Idrostatiche appartengono, quindi, alla categoria di quelle tecniche di conservazione degli alimenti che, pur eliminando dal prodotto forme microbiche potenzialmente pericolose per la salute umana e inibendo la proliferazione della microflora alterante, incidono relativamente poco sulle caratteristiche sensoriali e nutritive del prodotto.

In particolare, le Alte Pressioni Idrostatiche possono essere inquadrare nei processi atermici ("mild technologies" o "tecnologie morbide"), quelli per cui non è necessario elevare la temperatura del prodotto al fine di ottenere la distruzione delle forme microbiche presenti nel substrato alimentare.

Le Alte Pressioni, nel range di valori 50-1000 MPa, possono essere applicate ai cibi freschi per ottenerne la sterilizzazione ed il prolungamento della shelf-life. Vantaggi interessanti del trattamento degli alimenti mediante le Alte Pressioni sono soprattutto i minimi effetti sul sapore, colore e valore nutritivo dei prodotti alimentari trattati.

Le Alte Pressioni agiscono attraverso la distruzione della struttura secondaria e terziaria di molecole proteiche, mentre i legami covalenti sono generalmente non colpiti.

Questo esita nella denaturazione di grosse molecole proteiche, mentre molte componenti responsabili della qualità sensoriale e nutrizionale come i composti del colore e del sapore e le vitamine restano intatte.

Le Alte Pressioni possono essere utili ad intenerire la carne (100-150 MPa a 20-60°C per 2-30 minuti), ne migliorano la tessitura, favoriscono l'estrazione proteica nei prodotti carnei come prosciutto, salsicce e frankfurters (100-900 MPa per 2-30 minuti a 0-70°C).

In Giappone le Alte Pressioni sono usate per scongelare pesce congelato e ottenere prodotti ittici di nuova tessitura (da Zhao et al., 1998).

Lo scongelamento della carne congelata mediante applicazione delle Alte Pressioni avviene molto più velocemente dei metodi convenzionali. Per esempio 2 kg di beef congelato possono essere scongelati in 80 minuti se la pressione applicata è di circa 200 MPa, mentre a temperatura di 5°C e a pressione atmosferica sono richieste 7 ore per avere lo stesso risultato (Pothakamury et al., 1995).

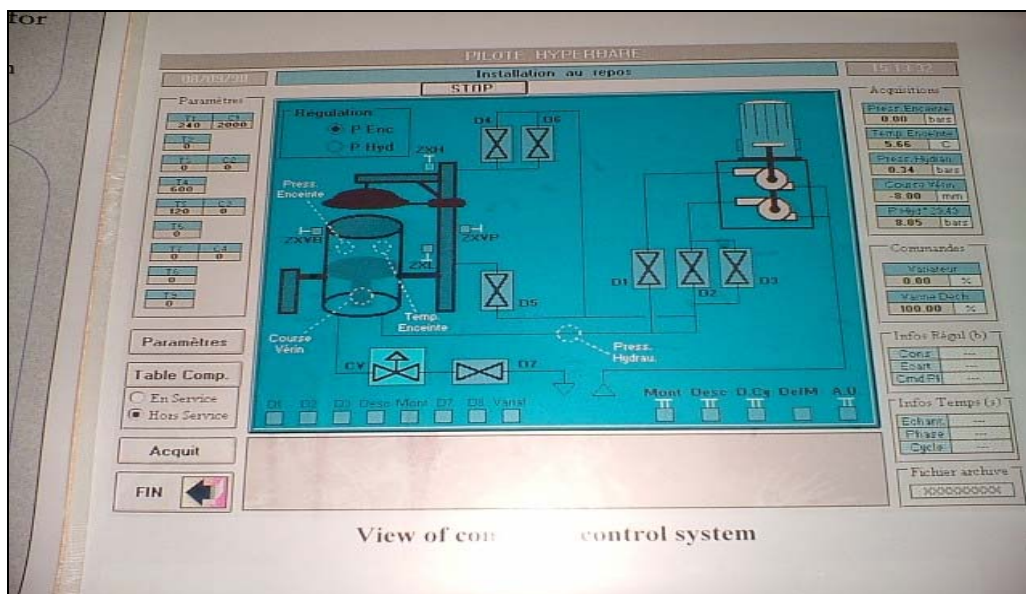


Fig. 1 schema di apparecchio per il trattamento degli alimenti con alte pressioni idrostatiche



Fig. 2 Macchina ad HHP



Fig. 3 Sistema Orizzontale Wave 6000/300 Tandem
(from Company Correa)

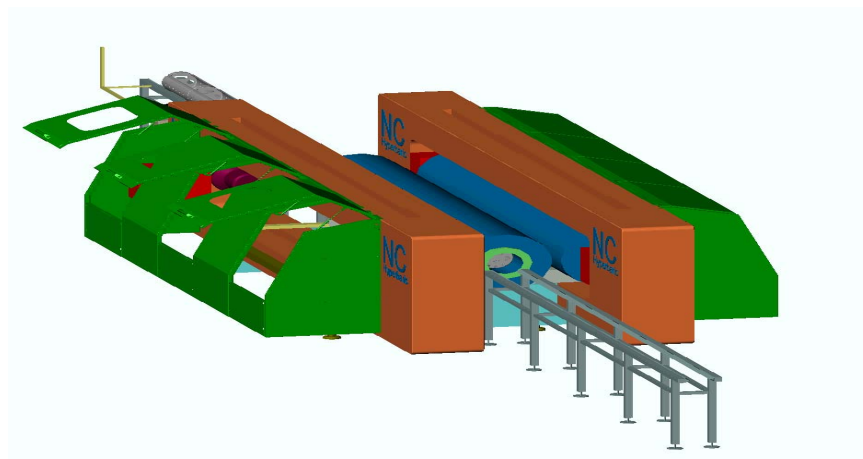


Fig. 4 Horizontal device Wave 6000/300 Tandem
(from Company Correa)

❖ **Alte Pressioni - principi generali**

Il sistema usato per il trattamento a scopo conservativo degli alimenti è, per definizione, un sistema di Alte Pressioni idrostatiche isostatiche. Secondo il principio di Pascal, se si esercita una determinata pressione in un punto su un fluido incompressibile (in questo caso l'acqua) la pressione si trasmette uniformemente e con la stessa forza in tutte le direzioni e, quindi, anche sulla superficie di un corpo (per es. l'alimento) immerso in quel liquido, indipendentemente da forma e dimensioni di quel corpo. L'unità di misura internazionale è il Pascal (Pa), ma per impieghi industriali si fa più spesso riferimento a milioni di Pascal, ossia ai MegaPascal (MPa).

1 MPa equivale a 10 bar, ossia a quasi 10 atmosfere. Nel settore industriale le pressioni idrostatiche impiegate superano i 100 MPa fino a raggiungere i 1000 MPa, per cui è comprensibile come uno dei problemi principali sia quello di avere un apparecchio sufficientemente robusto da resistere a pressioni così alte.

Le Alte Pressioni Idrostatiche si possono applicare sia agli alimenti liquidi che a quelli solidi, con la differenza che su quelli liquidi il trattamento può essere effettuato esercitando direttamente la pressione sull'alimento, mentre le derrate solide vanno necessariamente confezionate sotto vuoto in pellicola plastica e poi immerse in acqua.

La macchina ad Alte Pressioni è caratterizzata da un contenitore in metallo a pareti particolarmente spesse sufficienti a reggere la forza impressa sul liquido da un generatore di pressione, rappresentato da un sistema di pompe a stantuffo, che imprimono la compressione sull'acqua, che è il più comune liquido di trasmissione della pressione.

❖ Azione della pressione sulle molecole organiche e reazioni chimiche

L'impiego industriale delle Alte Pressioni Idrostatiche si fonda, come ricordato precedentemente, sul principio isostatico di Pascal.

La scienza delle Alte Pressioni introduce, inoltre, un secondo principio della fisica quello di Le Chatelier. Quest'ultimo stabilisce che applicando una pressione ad un sistema in equilibrio, saranno favorite quelle reazioni che portano ad una riduzione di volume, per limitare al minimo indispensabile gli effetti della pressione. Vengono favorite tutte le reazioni comportanti una diminuzione di volume (ad es., la rottura di molecole complesse fino ad ottenere molecole più piccole) e inibite quelle reazioni determinanti incremento di volume (la formazione di molecole di grosse dimensioni). Si può così dedurre come le Alte Pressioni Idrostatiche tendano a scindere molecole complesse e di grandi dimensioni, presenti negli alimenti, per dare origine ad altri composti più semplici. Quindi, le Alte Pressioni possono servire anche come un sistema per demolire macromolecole come le proteine e gli amidi al fine di ottenere i composti derivati. Questi ultimi, inoltre, possono incidere in maniera più o meno positiva sulle caratteristiche sensoriali del prodotto, come la consistenza, la quale generalmente tende a diminuire. La rottura delle molecole complesse è indotta dalla scissione dei legami chimici che le tengono unite. I legami chimici non sono colpiti allo stesso modo dalle Alte Pressioni.

I legami covalenti sono molto resistenti e non vengono scissi dall'azione della pressione, mentre i legami a ponte idrogeno, quelli a ponte disolfuro o ionici sono particolarmente sensibili ad essa. Di conseguenza, molecole di piccole dimensioni come le vitamine, in genere, non subiscono alcuna modificazione strutturale in seguito al trattamento

pressorio, mentre le proteine sono scisse in peptidi e aminoacidi, i carboidrati in zuccheri semplici o composti gelatinosi.

Tutto ciò porta alla diminuzione di consistenza del prodotto e alla gelatinizzazione degli amidi, con aumento della digeribilità dell'alimento.

Per quanto riguarda i microrganismi, anche su di essi l'effetto delle Alte Pressioni si manifesta con uno scompaginamento della struttura cellulare e delle funzioni cellulari, che in relazione all'entità può arrivare ad ucciderli. In genere, gli alimenti, a seconda della composizione, vengono trattati con pressioni che possono variare dai 200-300 fino ai 700-800 MPa. Si tratta essenzialmente di un processo atermico, che non determina alcun importante riscaldamento del prodotto alimentare. Si calcola che la temperatura del cibo aumenti in media di 2°-3°C ogni 100 MPa.

In altre parole, un trattamento con Alte Pressioni può portare un substrato alimentare da temperatura ambiente a circa 40°-45°C. Si tratta, quindi, di un processo che assicura un ottimo mantenimento delle qualità nutritive del cibo, dal momento che non intervengono alte temperature ad inattivare vitamine e proteine.

Proprio per gli effetti "di intenerimento" e "gelatinizzanti" che il trattamento con Alte Pressioni permette di ottenere, questa tecnologia trova svariate applicazioni nel settore dell'industria alimentare, ed in particolare per trattare alimenti quali succhi di frutta e marmellate, patés, sughi, piatti precucinati a base di carne, pesci ecc. Il primo prodotto alimentare trattato con Alte Pressioni Idrostatiche fu, in Giappone una marmellata.

Giappone
Confetture di frutta





USA



Italia



Portogallo

Succhi di frutta



Purée di frutta

Italia

Salsa di avocado
USA



In Francia vengono prodotti vari succhi di frutta con questo trattamento. Le muffe e i lieviti (che sono la componente più cospicua della flora microbica di questi alimenti) sono molto sensibili alle Alte Pressioni e quindi anche la qualità microbiologica del prodotto aumenta e la frutta deteriora più lentamente. Tuttavia, enzimi come la polifenossidasi, che causa il tipico imbrunimento sono resistenti alle Alte Pressioni e ciò può limitare la vita commerciale del frutto. È per questo motivo che il trattamento ad Alte Pressioni Idrostatiche viene riservato essenzialmente ad alimenti molto acidi o che vengono sottoposti anche a congelamento, per evitare appunto attività enzimatiche residue nel prodotto che potrebbero portare a sviluppo di colorazioni anomale. In ogni caso, le ricerche sinora condotte un po' in tutto il mondo hanno portato a risultati incoraggianti per molte gamme di prodotti.

❖ Azione della pressione sulla componente acquosa degli alimenti

Quando una soluzione acquosa viene compressa, l'energia di compressione E (Joule) è approssimativamente uguale a $E = 2/5 \times P \times C \times V_0$, dove P è la pressione (Pa), C la compressibilità della soluzione, e V_0 il volume iniziale (m^3).

Così l'energia di compressione di 1 litro di acqua a 400 MPa è uguale a 19,2 KJ, mentre 20,9 KJ è il valore energetico necessario per riscaldare 1 litro di acqua e portare la sua temperatura da 20 a 25°C. I livelli bassi di energia coinvolti nel processo pressorio permettono di spiegare il motivo per cui i legami covalenti dei costituenti dell'alimento sono di solito meno influenzati e danneggiati rispetto alle interazioni libere (Cheftel & Culioli, 1997). Numerose proprietà fisico-chimiche dell'acqua sono modificate in maniera reversibile sotto l'azione della pressione. Il decremento nel volume dell'acqua è nell'ordine del 40/0, 12%, 15%

rispettivamente a 100,400 e 600 MPa (a 22°C). Gli alimenti che contengono molta acqua e poco gas hanno una compressibilità simile a quella dell' acqua. La compressione adiabatica dell'acqua (o di soluzioni acquose) causa un incremento della temperatura di 2-3°C per ogni 100 MPa, in rapporto alla temperatura iniziale e al tasso di incremento della pressione. Il rilascio pressorio causa al contrario una diminuzione della temperatura. Tali variazioni nella temperatura sono però minimizzate e rese ininfluenti dagli scambi termici interessanti l'acqua, l'alimento ed il vasoio di metallo. La pressione, inoltre incrementa il prodotto ionico $[H^+] \times [OH^-]$ dell'acqua del 10% a 1000MPa. Questo effetto risulta, come nei casi precedenti, strettamente dipendente dalla temperatura. La separazione delle cariche positive e negative per azione della pressione è guidata da un fenomeno di "elettrostrizione" (definita come "forma di deformazione elastica di un dielettrico") dell'acqua. Le molecole dell'acqua si riordinano in modo più compatto intorno alle cariche elettriche, a causa delle interazioni dipolo-dipolo e dei legami idrogeno, con il risultato di un volume totale più piccolo. La dissociazione $2H_2O = H_3^+ + OH^-$ ha un ΔV di -22ml per ogni mole di acqua dissociata. Così il pH dell' acqua, degli acidi liberi, di numerosi buffer (eccetto gli amino buffer "Pressioneresistenti") decrementa di 0,2-0,5 unità di pH per ogni 100 MPa. Sebbene tali cambiamenti nel pH (e pOH) risultino reversibili (al rilascio pressorio si ritorna infatti alle condizioni di acidità iniziali), essi contribuiscono ai cambiamenti della molecola proteica che avvengono per effetto delle Alte Pressioni. Le transizioni di fase dell'acqua, specialmente la "cristallizzazione", sono influenzati dalla pressione. L'acqua può rimanere in uno stato liquido a temperature al di sotto di -22°C applicando una pressione di 207,5 MPa (Smelt, 1998). Infatti la pressione si oppone all'aumento di volume dovuto alla

formazione di cristalli di ghiaccio. Pressioni elevate possono indurre la formazione di piccoli cristalli di ghiaccio durante il congelamento pressione-indotto di soluzioni acquose. Questo fenomeno ha importanti implicazioni pratiche (Cheftel & Culioli, 1997):

1. E' possibile scongelare campioni biologici a basse temperature (tra -20°C e 0°C) sotto pressione.
2. E' possibile stoccare campioni biologici a temperatura tra 0°C e -20°C senza formazione di cristalli di ghiaccio, purchè essi vengano mantenuti sotto pressione.
3. Il congelamento ultrarapido ed uniforme può essere ottenuto quando un campione biologico è prima sottoposto ad una pressione di 200 MPa, poi raffreddato a -20°C (senza congelare) e la pressione sia rilasciata istantaneamente. La risultante microcristallizzazione potrebbe essere meno dannosa per l'alimento e la sua tessitura rispetto al congelamento tradizionale.

❖ Meccanismi d'azione delle Alte Pressioni sulle cellule microbiche

I danni ad esito letale che le Alte Pressioni idrostatiche determinano sulle cellule microbi che presenti in un alimento sono conseguenti principalmente a due tipi di meccanismi d'azione che intervengono

quando si sottopone l'alimento al trattamento pressorio. Questi due effetti sono:

- lo scompaginamento della membrana cellulare del microorganismo e distacco della sua parete esterna.
- la distruzione di alcuni enzimi fondamentali per le attività vitali della cellula microbica.

Gli effetti lesivi sulla membrana cellulare dei microrganismi riguardano essenzialmente la sua complessa e delicata struttura.

Risultano denaturate le proteine che insieme ai lipidi compongono la struttura della membrana, con conseguente alterazione della sua permeabilità. Gli scambi della cellula con l'ambiente esterno saranno in tal modo ostacolati.

La pressione danneggia inoltre alcuni enzimi-chiave del metabolismo microbico, bloccando in tal modo importanti e vitali funzioni della cellula, ne impediscono così la replicazione (azione batteriostatica) e successivamente la distruggono (azione battericida).

Una minuta analisi del danno alla membrana cellulare, dell'entità della denaturazione proteica e dell'abbassamento del pH intracellulare suggeriscono che gli enzimi di membrana, associati all'efflusso dei protoni, possono essere il principale target dell'azione pressoria. Tra questi enzimi è stato individuato F_0F_1 -ATPasi, legato alla membrana cellulare. Questo enzima potrebbe essere inattivato o dislocato per mezzo della pressione (Wouters et al., 1997; Smelt, 1998).

Le Alte Pressioni possono agire anche sulla morfologia cellulare e sulla motilità di organismi mobili come i Protozoi. La cessazione del movimento è direttamente correlata ai cambiamenti strutturali causati dalle Alte Pressioni. Questo effetto è anche dipendente dalla specie ed è spesso reversibile. Molti organismi ritornano alla loro normale forma e

riprendono la motilità dopo depressurizzazione. Riguardo agli effetti delle Alte Pressioni sul DNA delle cellule microbiche, ossia sul loro patrimonio genetico, il risultato è ben diverso. In effetti, il DNA è una molecola molto più resistente alle Alte Pressioni rispetto alle proteine ed ai carboidrati, per cui i trattamenti che di regola vengono applicati agli alimenti (200-900 MPa) non sono in grado di denaturarlo.

Si stima, infatti, che per denaturare le molecole di DNA occorranzo valori di pressione superiori ad 1 GigaPa (ossia a 1 miliardo di Pascal), pressioni attualmente non applicate e di certo danneggianti le caratteristiche sensoriali degli alimenti.

Questo aspetto differenzia sostanzialmente le Alte Pressioni Idrostatiche dalle radiazioni ionizzanti, che invece intaccano anche la struttura del DNA. Si possono così ipotizzare, ad opera delle radiazioni ionizzanti, effetti sul patrimonio genetico dei microrganismi e conseguente comparsa di varianti microbiche resistenti alle radiazioni e ad altri trattamenti di conservazione, a differenza di quel che accade nell'utilizzo delle Alte Pressioni.

❖ Cinetica delle Alte Pressioni

Uno schema di modello cinetico proposto per le Alte Pressioni è riassunto nella Tavola 1. Sebbene le deviazioni dalla log-linearità siano riportate frequentemente negli studi sull'inattivazione da calore, tali deviazioni sembrano essere più comuni nell'inattivazione da pressione (Smelt,1998). La deviazione dalla log-linearità potrebbe essere spiegata come una reazione a due fasi passante attraverso uno stadio intermedio. Se i calcoli con il processo termico sono complicati a causa dei profili della temperatura nel contenitore, i calcoli sono più semplici per quanto riguarda la pressione per il principio isostatico. D'altra parte, la pressione

può essere ignorata nello studio della resistenza termica a condizioni atmosferiche o lievemente più alte. Nel trattamento pressorio il cambiamento della temperatura quasi sempre gioca un ruolo dovuto al riscaldamento adiabatico. Interessante risulta l'effetto combinato di temperatura e pressione, in quanto mezzi efficaci nell'inattivazione dei microrganismi. I classici modelli bidimensionali tempo-temperatura sarebbe a questo punto rimpiazzati da modelli tridimensionali tempo-temperatura-pressione(Smelt, 1998). Gli effetti del tempo di risalita ("ramp rate" o "andamento rampa") e del tasso di depressurizzazione non sono stati ancora pienamente studiati. Un lento "ramp rate" potrebbe indurre una risposta di stress e perciò rendere il processo meno efficace, in quanto si ritiene che un veloce andamento della depressurizzazione possa contribuire ad un andamento veloce dell'inattivazione (Smelt,1998).

TAVOLA 1. Modelli di inattivazione dei microrganismi da mezzi fisici
Il tempo di riduzione decimale ("D-value") è usato per descrivere l'inattivazione dei microrganismi

$$\text{Log}(Nt/N_0) = a l - D/t$$

dove Nt = numero dei microrganismi al tempo t .

N_0 = numero iniziale dei microrganismi; $a l$ = costante;

D = "D-value" o valore D

t = tempo

Un'equazione empirica descrive la dipendenza di D alla temperatura:

$$\text{Log } D = a - T/z$$

dove a è una costante

z è il cosiddetto "valore z "

T è generalmente espresso in °C.

❖ Fattori influenzanti l'inattivazione microbica da Alte Pressioni

pH del substrato

YE et al.(1996) studiarono la tolleranza alla pressione di *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* in diversi terreni (agar, broth, marmellata di mela e succo di frutta), sottoponendo l'inoculo ad una pressione di 300 MPa a 5-25°C per 1-20 minuti. Essi riportarono che il pH dei terreni giocò un ruolo molto importante nella distruzione dei microrganismi. *S.epidermidis* fu inibito a livelli superiori al 90% da una pressione pari a 300 MPa in 11,2 minuti a pH 7,2 e in 4,8 minuti a pH 4,0. Roberts e Hoover (1996) studiarono gli effetti delle variazioni di pH sulla resistenza alla pressione del *B.coagulans* ATCC 7050. Essi riportarono un incremento nell'efficacia della pressurizzazione quando il pH del buffer fu abbassato.

Una diminuzione di 1,5 gradi logaritmici fu osservata quando il pH fu abbassato da 7,0 a 4,0. In passato Timson e Short (1965) osservarono che le spore furono più resistenti alle Alte Pressioni in condizioni di pH neutro, al contrario a valori bassi di pressione esse furono più sensibili se il pH si avvicinava alla neutralità. La variazione nel pH probabilmente va a colpire l'ATPasi di membrana e le funzioni intracellulari delle spore a tal punto da destabilizzare i microrganismi (MacDonald,1992). Questo effetto del pH sulla resistenza alla pressione di qualche microrganismo è accentuato da altri fattori come l'addizione di sali, le condizioni di temperatura, e altri parametri generali del processo. Risultati di altre

ricerche sperimentali hanno concluso che col diminuire del pH del substrato alimentare, la resistenza di *Listeria monocytogenes* alle Alte Pressioni tende a diminuire. In altre parole, se *Listeria* sopravvive benissimo a un trattamento a 300 MPa per 10 minuti in un substrato a pH 7,0 al contrario in un alimento a pH 5,3 lo stesso trattamento riesce ad inattivarla di almeno 2 gradi logaritmici. Le spore di *Bacillus coagulans* (microrganismo responsabile del "gonfiore" delle conserve) sono più sensibili alle Alte Pressioni quando il pH dell'alimento scende e aumenta la temperatura di trattamento. A 400 MPa per 30 minuti a 70°C, il loro numero scende di 4 gradi logaritmici a pH 6,0 e di 6 gradi logaritmici se il pH viene portato a 4,0. Se la temperatura scende a 25°C non si ottiene alcun risultato di devitalizzazione.

Aw (Water Activity)

L'Aw del substrato, nel quale i microrganismi si trovano durante il trattamento pressorio, influenza molto la resistenza delle cellule microbiche alla pressione. È riportato che a più basse Aw corrisponde la più elevata resistenza alla pressione.

Palou et al.(1996) studiò l'effetto combinato delle Alte Pressioni Idrostatiche e Aw sull'inibizione di *Zygosaccharomyces bailii*. Essi riportarono la completa inibizione del lievito a $Aw > 0,98$ ed un aumento della frazione sopravvissuta quando si ha una riduzione dell' Aw . Essi conclusero che l'addizione di saccarosio (allo scopo di abbassare l'Aw) agisce come elemento baro-protettivo, prevenendo l'inibizione del lievito persino alle Alte Pressioni. Un tale meccanismo può essere utilizzato per impedire l'inibizione di microrganismi favorevoli (ad es. i fermenti) durante il trattamento mediante le Alte Pressioni. Un lievito come

Rhodotorula rubra, che può dare colorazioni rossastre anomale agli alimenti, viene inattivato facilmente con 400 MPa per 15 minuti a 25°C in substrati con a_w superiore a 0,960, mentre se questo valore scende al di sotto di 0,920 per aggiunta di sali o zuccheri, la resistenza del lievito aumenta tanto che un trattamento analogo non è più in grado di inattivarne neanche una cellula.

Temperatura

La temperatura è un fattore di estrema importanza per la buona riuscita del risanamento degli alimenti trattati con le Alte Pressioni Idrostatiche, perché influenza in misura determinante la sensibilità o la resistenza dei vari microrganismi.

In linea generale, temperature dell'alimento molto diverse dalla temperatura ambiente aumentano la sensibilità dei microrganismi alle Alte Pressioni Idrostatiche e quindi

ne consegue un incremento del loro grado di inattivazione.

L'applicazione delle Alte Pressioni idrostatiche e del contemporaneo congelamento del prodotto offre buoni

risultati allo scopo di un efficace processo di risanamento, aspetto particolarmente interessante per i prodotti della pesca.

Anche la refrigerazione è sufficiente ad aumentare l'efficacia antimicrobica delle Alte Pressioni. Analogamente, anche un blando riscaldamento dell'alimento può avere effetti positivi sulla riduzione della carica microbica data dalle Alte Pressioni, specialmente nel caso dei batteri più resistenti, come *Staphylococcus aureus* ed *E. coli* O157:H7.

❖ Differenze nella resistenza microbica alle Alte Pressioni idrostatiche

I microrganismi non si dimostrano tutti ugualmente sensibili alle Alte Pressioni. I *lieviti* sono, tra tutti i microrganismi, quelli più sensibili. Sono sufficienti pressioni di 200-400 MPa per pochi minuti a 20°C per ridurre la carica di oltre 6 gradi logaritmici decimali. Mentre le forme vegetative delle *muffe* risultano sensibili a bassi valori pressori, le loro spore al contrario sono particolarmente resistenti. Le forme vegetative di lieviti e muffe sono generalmente inattivate da pressioni comprese tra 200 e 300 MPa. Per quanto le spore di molti lieviti e muffe siano facilmente inattivate da pressioni di circa 400 MPa, le ascospore di *Byssoschlamys* sono molto resistenti sia al calore che alla pressione. Un trattamento pressorio di 700 MPa a 70°C, della durata di 15 minuti, non fu sufficiente a ridurre il numero di ascospore di un fattore $> 10^3$. Per quanto riguarda i batteri, sino ad alcuni anni fa si riteneva che i batteri Gram negativi (ad es., le enterobatteriacee) fossero più sensibili alle Alte Pressioni Idrostatiche dei Gram positivi, perché i primi hanno una membrana cellulare più complessa e, quindi, più delicata dei secondi. Recenti studi hanno, tuttavia, dimostrato che tra i batteri vi è un ampio range di sensibilità alle Alte Pressioni, anche nell'ambito di uno stesso genere.

Per cui è possibile che determinate specie di Gram negativi siano più resistenti dei Gram positivi alle Alte Pressioni. È nota, infatti, l'elevata resistenza alle pressioni di alcuni ceppi di *Escherichia coli* verocitotossici. Molti cocci Gram positivi, come enterococchi e *Staphylococcus aureus*, risultano molto resistenti alle Alte Pressioni rispetto a bacilli Gram negativi, come *Campylobacter* e *Pseudomonas* spp. Nell'ambito di uno stesso Genere microbico, inoltre, esistono differenze nella sensibilità alle Alte Pressioni tra le varie specie, come dimostrato in molte indagini su *Salmonella* spp. Le *Salmonella* sono un

gruppo di batteri patogeni interessanti diversi prodotti alimentari, incluse le carni di pollame. È su questo substrato che Metrick et al. (1989) hanno studiato il potenziale pressorio necessario all'inattivazione di *Ssenftenberg 775W*, un ceppo del genere *Salmonella* molto resistente al calore ($D_{57,5^{\circ}\text{C}} = 15$ minuti) e di *S.typhimurium ATCC7136*, un ceppo del genere *Salmonella* sensibile al calore ($D_{57,5^{\circ}\text{C}} = 3$ minuti).

I due ceppi di *Salmonella* furono sottoposti a pressioni comprese tra 2380 e 3400 atm a 23°C sia in phosphate buffer (pH 7) sia in un medium a base di pollo (omogeneizzato per infanti). I risultati della ricerca misero in evidenza la maggiore sensibilità alle Alte Pressioni di *S.senftenberg 775W* rispetto a *S.typhimurium ATCC 7136*.

È chiaro, quindi, che non è necessaria una correlazione tra resistenza al calore e resistenza alle Alte Pressioni da parte dei microrganismi. Inoltre elevate percentuali di mortalità erano riscontrate nei campioni di phosphate buffer, a significare l'azione protettiva nei confronti dei microrganismi da parte dei nutrienti contenuti nel medium a base di pollo.

Le spore batteriche e quelle delle muffe sono tutte molto resistenti alle Alte Pressioni Idrostatiche. Le spore di *Clostridium* spp. tendono ad essere più resistenti di quelle di *Bacillus* spp..

Bisogna considerare, inoltre, che pressioni fino a 400 MPa non sono in grado di inattivare le spore, ma semplicemente ne inducono la germinazione. Invece, per quanto riguarda la resistenza alle Alte Pressioni Idrostatiche dei virus, risulta che trattamenti con pressioni pari o superiori a 400 MPa sono in grado di inattivare direttamente alcuni virus (HIV, virus dell'influenza e gli *Herpesvirus*). Per quanto concerne la possibile inattivazione con le Alte Pressioni Idrostatiche delle tossine batteriche, si sa che la tossina botulinica può essere inattivata con dosi di

pressione superiori a 600 MPa mentre per la patulina (una delle micotossine più pericolose) un analogo trattamento è in grado di inattivarla soltanto in parte (sappiamo che un trattamento a 500 MPa per 60 minuti a temperatura ambiente è in grado di inattivare l'80% della patulina presente in un concentrato di mela e il 47% della stessa patulina in succo di mela).L'applicazione delle Alte Pressioni può risultare utile anche nel risanamento di prodotti ittici da *parassiti* come l' *Anisakis simplex*, nematode presente in molti pesci, responsabile, soprattutto in Giappone, di episodi di intossicazione alimentare ad esito spesso mortale, dovuti ad ingestione di pesce crudo o trattato e conservato in maniera non corretta.

L'Anisakis è sensibile alle alte temperature (infatti la normale cottura o trattamenti termici per la sterilizzazione di conserve garantiscono la sicurezza del prodotto), all'affumicamento a caldo, alle temperature di congelamento, alle radiazioni ionizzanti.

Il pesce conservato utilizzando una concentrazione ad elevato contenuto salino (20-30%) richiede un lungo periodo (4 settimane) per la distruzione della larva.

Nel pesce marinato le larve possono sopravvivere a lungo fino a 10 settimane.Il trattamento mediante pressioni di 200 MPa per 10 minuti, a temperature comprese tra 0-15°C, uccide tutte le larve di *Anisakis* presenti nell'alimento(Molina-García,2002). Con più basse pressioni (<140MPa) il tempo di trattamento deve essere incrementato fino a superare un'ora per ottenere lo stesso risultato (Molina-García, 2002)

❖ **Resistenza microbica alle Alte Pressioni e composizione chimica dell'alimento**

La composizione chimica dell' alimento incide fortemente sulla

resistenza dei microrganismi alle Alte Pressioni. La presenza nell'alimento di nutrienti come zuccheri, lipidi o sostanze azotate contribuisce ad aumentare la loro resistenza. Infatti i batteri che sopravvivono ad un trattamento pressorio, anche se danneggiati dalla pressione, hanno la possibilità di rivitalizzarsi grazie al substrato ricco di fonti energetiche.

Una coltura di *E. coli* 0157:H7 in semplice soluzione nutritiva, dopo trattamento a 375 MPa per 30 minuti a 20°C, presenta una riduzione della carica iniziale di oltre 6 gradi logaritmici, mentre in campioni di carne di pollo la riduzione di carica è di soli 2,5 gradi logaritmici e una riduzione di appena 1,75 gradi logaritmici si registra in campioni di latte. Anche la riduzione del valore di attività di acqua libera (a_w) può aumentare la resistenza dei batteri alle Alte Pressioni.

Questo aspetto è importante per tutti quei prodotti in cui appunto si ricorre all'aggiunta di sale o zuccheri per la produzione e la conservazione.

Sulla resistenza dei microrganismi alle Alte Pressioni ha influenza anche il tipo di soluto che si aggiunge agli alimenti.

I sali, come il cloruro di sodio e il cloruro di calcio, aumentano la resistenza dei microrganismi alle Alte Pressioni rispetto a composti non ionici come zuccheri e glicerolo.

Dal punto di vista pratico, ciò significa che alimenti particolarmente secchi come le spezie non possono essere sottoposti a processo pressorio efficacemente per il loro basso valore di a_w .

Se si tratta un alimento con Alte Pressioni Idrostatiche il suo valore di pH tende ad abbassarsi durante il trattamento, ma non ci sono regole precise per determinare questo calo del pH verso l'acidità.

In teoria, trattando un succo di frutta a 500 MPa il suo pH dovrebbe

scendere sotto 1,0 applicando le Alte Pressioni, ma quando la pressione viene rilasciata, il pH ritorna subito ai suoi valori normali. Ad una così forte acidificazione si attribuisce in parte l'effetto battericida delle Alte Pressioni. Gli additivi alimentari possono influire in vario modo sulla sensibilità dei microrganismi alle Alte Pressioni Idrostatiche. L'acido sorbico agisce come un acido organico interferendo con la membrana batterica alterandone la permeabilità. La sua azione antimicrobica risulta, però, più attiva ed efficace in combinazione con la pressione (Smelt, 1998). Il sorbato di potassio e gli antiossidanti come il BHA (butilidrossianisolo, in additivo di sintesi) aumentano la sensibilità di *L. monocytogenes* alle Alte Pressioni, mentre altri antiossidanti come l'ascorbato di sodio non hanno lo stesso effetto. Va ricordato che nessuno di questi additivi è in grado di inattivare questo batterio se non è sottoposto alle Alte Pressioni. I microbi sono più sensibili alla nisina sia durante che dopo il trattamento pressorio. *B.coagulans* fu sottoposto a combinazioni di UHP (400 MPa), temperature miti, pH acido e addizione di nisina. Quando la nisina (0.8 IU/ ml) fu aggiunta al medium si ottenne una riduzione delle colonie di almeno 6 gradi logaritmici. Sembra che i batteri Gram-negativi, come *E.coli* e *Salmonella*, che in condizioni normali sono resistenti alla nisina, possano essere sensibilizzati alla nisina quando pressurizzati. Questo potrebbe essere spiegato dalla specifica azione della nisina. La nisina, infatti, interagisce con la membrana cellulare e si ipotizza possa penetrarvi all'interno. Ne deriva un'azione lesiva verso la cellula più diretta ed efficace. Durante il trattamento pressorio *E.coli* fu sensibilizzato al lisozima, alla nisina e all'EDTA, considerati singolarmente, e sensibilizzato persino di più a combinazioni di questi composti (Smelt, 1998).

❖ Effetto battericida delle Alte Pressioni associate a batteriocine

Numerosi Autori hanno dimostrato l'effetto sinergico nell' azione battericida delle Alte Pressioni e di alcune batteriocine addizionate ad un alimento sperimentalmente contaminato.

Quando il trattamento pressorio è combinato con antimicrobici, come le batteriocine, il livello di distruzione/inattivazione microbica può essere incrementato.

Per esempio lo *Staphylococcus*, che è tra i microrganismi più resistenti alla pressione, mostrò più basse conte nei campioni includenti nisina dopo trattamento di pressurizzazione (400 MPa, 10 minuti) e stoccaggio a 4°C, rispetto ad altri batteri. Un'elevata inattivazione di *E.coli* (>6 Log) in presenza di nisina fu verificata da Garriga et al.(2002).

❖ **Sensibilità alle Alte Pressioni dei microrganismi presenti nella carne**

Numerosi studi hanno trattato la sensibilità alla pressione di vari microrganismi naturalmente presenti o introdotti in carne fresca o lavorata. Il trattamento pressorio di omogeneizzati di carne di maiale (pH 6-7) a 400 MPa e 25°C per 10 minuti ridusse di almeno 6 gradi logaritmici le popolazioni di *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Y:enterocolitica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* inoculate a livelli di 10^6 - 10^7 CFU/g (Shigehisa et al.,1991). Con *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, un tasso di riduzione simile richiese 500 o 600 MPa per 10 minuti. Le spore di *B.cereus* non furono inattivate. Carne di manzo trita inoculata con *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii* e *Listeria innocua* (essendo gli ultimi due

modellinon patogeni per *Salmonella spp.* o *Listeria monocytogenes* rispettivamente) fu sottoposta ad un processo pressorio per 20 minuti (Carlez et al.,1993). A 20°C un tasso di inattivazione di 5 gradi logaritmici o più fu ottenuta sopra i 200 MPa per *P. fluorescens*, sopra i 280 MPa per *C.freundii* e sopra i 400 MPa per *L.innocua*. Temperature più elevate (35 o 50°C) o più basse (4°C) esaltano gli effetti della pressione. La più grande riduzione fu osservata a 50°C. La flora endogena della carne trita, incluso *Pseudomonas spp.*, apparve essere più resistente alla pressione degli organismi usati per l'inoculo (Carlez et al.,1994): il trattamento di carne trita fresca a 200-300 MPa (20 minuti, 20°C) fu moderatamente efficace e ritardò la crescita microbica di 2-6 giorni nello stoccaggio della carne a 3°C (all'aria o sottovuoto) confezione finale sigillata. Il processo a 400 e 450 MPa sembrò inattivare completamente tutti i microrganismi testati (*Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Coliformi*)eccetto la flora totale che fu ridotta da 3 a 5 gradi logaritmici. Comunque, dopo un periodo di latenza che dipese dall'intensità del processo pressorio, cellule di *Pseudomonas spp.* furono ancora isolate e ripresero a crescere. La shelf-life del prodotto, stoccato a temperature di refrigerazione (3°C), fu così estesa da 10-15 giorni. Da una serie di esperimenti usanti carne trita inoculata con un ceppo di *Pseudomonas*, emerse che una percentuale relativamente bassa di cellule (0,01%) non fu inattivata ma solo lievemente danneggiata dalle Alte Pressioni e potrebbe quindi riprendere a crescere dopo una fase di riparazione di 3-9 giorni a 3°C. L'applicazione delle alte pressione, inoltre, inattiva parassiti che possono essere presenti nella carne o nel pesce crudo. Trattamenti sopra i 175 MPa (10 minuti, 25°C) mostrarono di inattivare efficacemente *Trichinella spiralis* presente nel muscolo di cavia (Ohnishi et., 1993).

❖ Azione della pressione sui microrganismi sporigeni

Le spore batteriche sono note per la loro resistenza alla pressione. Esse possono sopravvivere a pressioni sopra i 1000 MPa.

Spore di *B.subtilis* sopravvivono a trattamenti pressori di 1000 MPa per 40 minuti ed a temperatura inferiore a 10°C. E' stato però osservato (da Michiels et al,1998) che per le spore di vari *Bacillus spp.* l'inattivazione risulta essere più efficace a pressioni moderate (200-500 MPa) rispetto alle Alte Pressioni (>500 MPa).

Questo fenomeno si spiega con il fatto che la pressione può indurre le spore a germinare e a perdere così la resistenza a pressioni elevate e al calore.

Questa germinazione pressione-indotta è dipendente soprattutto dalla temperatura, essendo assente a $T^{\circ} < 10^{\circ}\text{C}$ e più pronunciata a T° di 40-50°C. Purtroppo la conoscenza dei fattori influenzanti la germinazione pressione-indotta ed i meccanismi che la determinano è pressoché limitata.

Alcuni studiosi mostrarono che pressioni di 25 MPa aumentano l'attività dell'alaninaracemasi nelle spore di *B.cereus*, enzima coinvolto nella germinazione delle spore.

La pressione potrebbe indurre cambiamenti conformazionali negli enzimi delle spore, conducenti alla loro attivazione. Hayakawa et al. (1994) comparò la resistenza alla pressione di spore di ceppi di *Bacillus*. Le spore furono coltivate su agar nutriente e sospese in acqua distillata sterile fredda con il filtrato riscaldato a 80°C per 30 minuti per distruggere le forme vegetative. Le spore di questi sei ceppi furono poi trattate sotto pressioni nel range 196-981 MPa a 5-10°C per tempi di mantenimento di 20-120 minuti. Fu trovato che *B.stearothermophilus*

IAM 12043, *B.subtilis IAM 12118* e *B.licheniformis IAM 13417* avevano la maggiore resistenza alla pressione, ma *B.coagulans* fu di solito attivato quando trattato con Alte Pressioni. Da Michiels et al.(1998) fu sperimentata la sensibilità delle spore di *B.subtilis* germinate a 100 e a 500 MPa per 30 minuti ad esposizioni a pressioni di 600 MPa della durata di 10 minuti.

Risultò che le spore germinate a 100 MPa furono molto sensibili ad inattivazione a 600 MPa, mentre quelle germinate a 500 MPa rimasero intatte, nonostante si erano ottenuti gli stessi livelli di germinazione a 100 e a 500 MPa.

La pressione sembra indurre le spore a germinare e a perdere la loro resistenza alla pressione, cosicché le spore germinate sarebbero inattivate successivamente dalla pressione.

Le spore germinate a basse pressioni ($P = 100$ MPa) furono molto più sensibili all'inattivazione da pressioni del valore di 600 MPa delle spore germinate ad Alte Pressioni (500 MPa).

Questo può essere spiegato postulando una differenza nel processo di germinazione verificantesi a 100 rispetto a 500 MPa e conducente a differenti in senso qualitativo spore germinate (a 100 MPa si ha una rapida formazione di ATP e si ha l'attivazione di reazioni enzimatiche nelle spore germinate, mentre alle Alte Pressioni alcuni enzimi-chiave sono inattivati).

Pressioni di circa 400 MPa associate a temperature di 60-90°C e/o cicli di pressione tra 50-400 MPa sono sufficienti ad inattivare le spore di *B.cereus* (Patterson et al,2001).

Secondo molti Autori l'OSCILLATORY PRESSURE CYCLING è una tecnica più efficace nell'inattivare le spore batteriche. Le pressioni sopra i 1000 MPa sono necessarie per inattivare le spore di *Cl.sporogenes* in

un medium a base di carne o carota. Una riduzione di massimo 1.5log fu ottenuta quando trattamenti superiori a 1500 MPa a temperatura ambiente furono applicati. Un altro studio mostrò nessuna inattivazione di *Cl.sporogenes* usando una pressione di 600 MPa per 60 minuti a 60°C. Trattamenti termici seguiti da pressioni più miti potrebbero essere più promettenti. Le temperature sopra i 75°C seguiti da un trattamento a 800 MPa furono sufficienti per inattivare *Cl.sporogenes* con un fattore di almeno 10⁵. Questi risultati dovrebbero essere confermati per bene e relazionati al *Cl.botulinum* al fine di assicurare la sicurezza del processo. Un trattamento di 680 MPa a temperatura ambiente per 60 minuti diede come risultato una riduzione 5 gradi logaritmici di *Cl.sporogenes* nel petto di pollo. Un tasso di inattivazione da 4 a 6 gradi logaritmi ci è ottenuta quando le spore di *B.stearothermophilus* furono sottoposte da 4 a 6 cicli di pressione di 600 MPa a 70°C di 5 minuti ciascuno. Applicando trattamenti di pressione oscillatoria alternanti tra 60 e 500 MPa con tempi di mantenimento di 1 minuto si potrebbe ridurre il numero di spore di *B.subtilis* di un fattore > 10⁸ (Smelt,1998).

❖ Alte pressioni associate ad altri processi fisici di conservazione degli alimenti

1. Pressione e Temperatura

Alpas et al.(1998) studiarono l'interazione di pressione, tempo e temperatura sulla vitalità di *Listeria innocua*, ceppo CWD47, in soluzione peptone, sottoponendo i campioni alle pressioni nel range di 138-345 MPa, alle temperature comprese nei limiti di 25-50°C e a tempi di esposizione di 5-15 minuti. Essi mostrarono che la combinazione di 345 MPa, 50°C e 9, 1 minuti potrebbe ridurre la popolazione microbica di 7 gradi logaritmici. La ricerca di Maggie et al.(1995) riguardò

l'applicazione delle Alte Pressioni finalizzata all'inattivazione delle spore di *Clostridium pasteurianum*, isolato da pomodoro e inoculato nel siero di pomodoro. Essi riportarono che i trattamenti con pressioni di 900 MPa per 5 minuti a 60°C distrussero completamente le spore. Risultato questo che non fu ottenuto a temperature < 60°C. Pressurizzazioni di 700 e 800 MPa per 5 minuti a 60°C furono associate a valori D di 2,4 e 3,4 minuti, rispettivamente. Gli Autori inoltre studiarono un pretrattamento mediante applicazione della pressione, seguito da un trattamento termico, per l'inattivazione delle spore e trovarono che il pretrattamento con pressioni di 300 MPa e 500 MPa, per 1 minuto e a 60°C, ridusse la resistenza termica delle spore rispettivamente di un terzo e della metà.

Lo studio di Roberts e Hoover (1996) si basò sull'inattivazione di *Clostridium sporogenes* P A3 679 e *Bacillus subtilis* 168 attraverso l'impiego di combinazioni di pressione, temperatura, acidità del substrato e addizione di nisina. Essi esposero i campioni (buffers a pH 4,7 inoculati con le spore) a pressioni di 405 MPa, a differenti temperature (25-90°C), per 15 e 30 minuti. Dopo trattamento pressorio le spore furono seminate in piastre addizionate di nisina e non. Gli Autori verificarono un incremento nell'inattivazione delle spore al diminuire del pH. Inoltre, la sterilizzazione fu ottenuta utilizzando temperature più elevate associate a valori moderati di pressione. Una pressurizzazione di 405 MPa a 45°C per 30 minuti risultò nella completa inibizione di *Clostridium sporogenes* a pH 4, mentre temperature di 90°C produssero la sterilizzazione a pH nel range 4-6. *Bacillus subtilis* fu completamente inibito da pressioni di 405 MPa, applicate ad una temperatura di 70°C per 15 minuti in un buffer a pH 4. L'aggiunta di nisina comportò un'ulteriore riduzione delle conte batteriche. Maggi et al.(1996) studiarono l'effetto combinato di pressione e temperatura

sull'inattivazione delle spore di *Clostridium sporogenes* PA3679 (ATCC7953) in un medium liquido a pH 7 (medium di manzo o carota e phosphate buffer). Essi riportarono che pressioni di 1500 MPa applicate ad una temperatura di 20°C per 5 minuti non determinarono alcuna inattivazione delle spore, al contrario pressioni di 1500 MPa a 60°C inattivarono completamente le spore ed una pressione di appena 800 MPa a 80-90°C determinò la sterilizzazione del medium di manzo o carota. Anche Rovere et al. (1996) studiarono l'azione sinergica delle Alte Pressioni (> 1500 MPa) e delle temperature (20-88°C) relativamente alla distruzione delle spore di *Clostridium sporogenes* PA3679. Essi conclusero che l'inattivazione totale delle spore batteriche potrebbe essere ottenuta impiegando una pressione pari a 1000 MPa e temperature di 50-60°C

2. Pressione e Radiazioni

Crawford et al. (1996) studiarono l'uso combinato di pressione e irraggiamento per distruggere le spore di *Clostridium sporogenes*, inoculate nel petto di pollo. Il risultato della loro sperimentazione fu la riduzione di 5 gradi logaritmici a temperatura ambiente (25°C) con una pressione di 689 MPa, applicata per 60 minuti. Il riscaldamento dei campioni a 80°C per 20 minuti ottenne un numero inferiore di spore sopravvissute. La loro ricerca mostrò che l'alta pressione ridusse la dose di irraggiamento richiesta per prolungare la shelf-life della carne di pollo. Gli Autori affermarono che il pretrattamento con radiazioni, a cui faccia seguito l'applicazione delle Alte Pressioni, risulta un'utile tecnica per l'inattivazione delle spore di *Clostridium sporogenes*, che riduce la dose di radiazione richiesta per eliminare le spore. Paul et al. (1997) analizzarono l'effetto delle Alte Pressioni e

dei raggi γ , considerati singolarmente, oltre a trattamenti combinati pressione radiazioni, sulla qualità della carne d'agnello durante lo stoccaggio a temperature di refrigerazione. La γ -irradiazione (1,0 kGy), la pressurizzazione (200 MPa per 30 minuti a 30°C) e una combinazione di entrambi i processi, furono usati per esaminare la shelf-life di carne di agnello trita dopo trattamento e stoccaggio a 0-3°C. Tutti i coliformi furono inattivati dall'associazione di questi due trattamenti mentre *Staphylococcus spp.* mostrò una riduzione di solo 1 grado logaritmico quando trattato con irradiazione o pressione. Al contrario, un procedimento combinato ottenne la totale inattivazione di *Staphylococcus spp.* presente nei campioni. Il numero iniziale di cellule, nei campioni non trattati, era di 10^4 cfu/g. Inoltre, basse conte di cellule danneggiate furono ritrovate solo dopo 3 settimane di stoccaggio successive al trattamento.

3. Pressione - Tempo - Temperatura

Fornari et al.(1995) determinarono le modalità di inattivazione di *Bacillus spp.* usando una combinazione di pressione, tempo e temperatura. Essi saggiarono la sensibilità alle Alte Pressioni di alcuni *Bacillus spp.* (*B.cereus*, SSICA/DA1, *B.licheniformis* SSICA/DA2, *B.coagulans* SSICA 1881, *B.stearothermophilus* SSICA/T460) sottoponendo i campioni preparati a pressioni nel range di 200-900 MPa, applicate per 1-10 minuti a 20, 50, 60 o 70°C. Essi inoltre esaminarono l'effetto di cicli di pressione sull'inattivazione delle spore (trattamenti di 200-500 MPa seguiti da trattamenti di 900 MPa). Essi trovarono che *B.cereus spp.* fu molto sensibile al processo pressorio ciclico. L'inattivazione delle endospore a livelli di 4×10^5 /ml fu ottenuta a temperatura ambiente con un trattamento a 200 MPa per 1 minuto seguito da 900 MPa per 1 minuto. *B.licheniformis* fu inattivato a 800

MPa per 5 minuti a 60°C. *B.coagulans* fu ridotto a concentrazioni di 104 endospore/ml dopo l'applicazione di pressioni di 900 MPa per 5 minuti a 70°C. *B.stearothermophilus* fu inattivato a 700 MPa per 5 minuti a 70°C. Shigehisa et al. (1991) riportarono la completa distruzione di *Salmonella typhimurium* a 300 MPa dopo 10 minuti a 25°C. Carlez et al.(1993) osservarono che *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua* furono completamente inattivati rispettivamente a pressioni >280, 200 e 400 MPa, a 20°C. Essi inoltre notarono un colore più pallido nei campioni di carne di manzo trita trattata a pressioni > 150 MPa, e un colore grigiastro nei campioni sottoposti a pressioni > 350 MPa.

❖ Azione antimicrobica delle Alte Pressioni in diversi alimenti

EL Moueffak et al.(1996) compararono gli effetti di pressioni moderate (300 e 400 MPa) a 50°C, in relazione all'inattivazione di microrganismi patogeni inoculati in campioni di "foie gras", con quelli ottenuti mediante pastorizzazione termica (80°C).

Essi riportarono che la riduzione delle forme vegetative dei contaminanti mesofili e psicotropi e la distruzione di *coliformi* e *Staphylococcus aureus* derivarono sia dalla pastorizzazione termica che dal trattamento dei campioni a 400 MPa, per 10 minuti a 50°C. Erkmen e Karatas (1997) studiarono l'effetto delle Alte Pressioni sullo *Staphylococcus aureus* (ATCC 27690) nel latte a pressioni nel range di 50-350 MPa per più di 12 minuti a temperatura costante (20°C +/- 2°C). Essi non isolarono cellule sopravvissute a trattamenti pressori di 350 MPa (6 minuti) e 300 MPa (8 minuti).

Dalla ricerca risultarono i seguenti valori D: 211.8, 15.0, 3.7 e 2.6 minuti rispettivamente a 200, 250, 300 e 350 MPa.

Gervilla et al. (1997b) studiarono gli effetti delle Alte Pressioni sui ceppi *E.coli* 405 CECT e *Pseudomonas fluorescens* 378 CECT nel latte ovino, dopo aver sottoposto i campioni di latte inoculati a differenti combinazioni di pressione, temperatura e tempo. La temperatura giocò un ruolo molto importante nell'inattivazione delle cellule microbiche, conseguendo livelli di riduzione >6 log cfu/ml nelle popolazioni microbiche, che furono osservati a 50°C per tutte le combinazioni pressione-tempo.

Essi riportarono che il ceppo test di *E.coli* fu più resistente alla pressione del ceppo di *Pseudomonas fluorescens*.

Ponce et al. (1998) studiarono l'inattivazione di *Listeria innocua* inoculata in un uovo intero allo stato liquido usando le Alte Pressioni, sottoponendo l'alimento a differenti combinazioni di pressione, temperatura e tempo. La totale inibizione di *L.innocua* non fu riportata, tuttavia la riduzione fu > 5 log (450 MPa a 2°C per 15 minuti). I valori D per *L.innocua* furono pari a 7.35 minuti a 400 MPa a 2°C e 8.23 minuti a 400 MPa a 20°C. Essi inoltre osservarono che la riduzione di *L. innocua* fu più significativa a 2°C e -15°C che a temperatura ambiente, a pressioni di 300 e 350 MPa. Essi spiegano questo comportamento come dovuto \ ad una maggiore sensibilità di alcune proteine alle basse temperature, conducente ad una loro rapida denaturazione. Questo è uno dei pochissimi studi che impiegò le Alte Pressioni a temperature sottozero.

❖ **Congelamento e Scongelo da Alte Pressioni**

Deuchi e Hayashi (1992) esaminarono l'applicazione delle Alte Pressioni

a temperature sottozero nella conservazione di diversi alimenti, analizzando il rapido congelamento o scongelamento che si può ottenere mediante pressurizzazione. Essi stoccarono vari alimenti crudi, inoculati con microrganismi sensibili al freddo, a temperature da -5 a 20°C applicando una pressione compresa tra 50 e 200 MPa per pochissimi giorni o settimane. Essi constatarono che: le fragole avevano mantenuto integra la freschezza, il sapore, il colore e la tessitura; la carne di maiale cruda non presentava sgocciolatura; molti microrganismi (*coliformi*, *Enterobacteriaceae*, *psicrotropa Gram-negativi e Gram-positivi*, *enterococchi e lattobacilli*) furono ridotti di numero; l'inattivazione da freddo degli enzimi fu parzialmente evitata. Gli Autori conclusero che lo stoccaggio degli alimenti, sotto pressione moderata e a temperature al di sotto dello zero, preservò le naturali caratteristiche degli alimenti impedendone il deterioramento da parte di contaminanti microbici.

❖ **Prospettive d'impiego delle Alte Pressioni**

Le Alte Pressioni offrono un'alternativa interessante alla pastorizzazione termica in quanto processo conservativo di cibi liberi da additivi, oltreché microbiologicamente sicuri e stabili.

Le Alte Pressioni consentono di aumentare la conservabilità di svariati prodotti alimentari e ne migliorano la qualità igienica, attraverso l'eliminazione di forme microbiche patogene o alteranti eventualmente presenti all'interno.

Inoltre, si tratta di un sistema molto interessante per i vantaggi che prospetta nel mantenimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito. I risultati migliori si potranno ottenere associando le Alte Pressioni Idrostatiche ad altri sistemi, tradizionali o innovativi, come il congelamento, le radiazioni ionizzanti, il confezionamento in atmosfera

protettiva, il riscaldamento a microonde. Nessuno sforzo è stato fatto per validare l'uso delle Alte Pressioni. La standardizzazione dei parametri fisici relativi al processo pressorio (quelli ad esempio efficaci per la completa eliminazione dei batteri patogeni) è ancora da studiare. È importante, a tal proposito, che i criteri standard operanti e le condizioni di processo siano stabiliti al fine di garantire l'attendibilità del trattamento pressorio. Per esempio, il processo termico ha come valori standard il "D-value", "Z-value", i tempi di mantenimento e le temperature applicate per i differenti alimenti. Gli standard per le Alte Pressioni devono ancora essere fissati. Pochissimi studi sull'inattivazione da Alte Pressioni dei microrganismi concernono gli effetti indotti dalla pressione in termini di "D-value" associato al ceppo batterico di riferimento (tabella I). È necessario che molte ricerche si orientino in tal senso, così che un database di "D-value" delle Alte Pressioni per numerosi microrganismi possa essere preparato. Senza un database "D-value" ben documentato, non c'è modo di comparare efficacemente i risultati degli esperimenti eseguiti con differenti microrganismi sotto differenti condizioni di processo (Smelt,1998). C'è bisogno di standard comparabili che indichino la resistenza dei microrganismi a combinazioni di pressione e temperatura impiegate nel processo ad Alte Pressioni. I molteplici "D value", a valori costanti di temperatura e pressione, possono essere usati come una indicazione della resistenza di una particolare specie batterica rispetto ad altre specie

La prassi seguita nell'industria alimentare è di sottoporre i prodotti alimentari a trattamenti termici che assicurino una riduzione 12 D dei microrganismi. Bisogna assicurarsi che le Alte Pressioni siano parimenti efficaci nell'inattivare i microrganismi. Forse non desta stupore la mancanza di un database di valori D e Z per le specie microbi che

sottoposte ad Alte Pressioni. Va ricordato, infatti, che questi parametri sono derivati dagli effetti di tempo-temperatura senza riguardare la pressione. Questo non significa che si possano prevedere i valori riferiti a pressione, temperatura e tempo richiesti a eliminare i batteri completamente dagli alimenti utilizzando le Alte Pressioni. Per validare pienamente il processo ad Alte Pressioni una relazione deve essere sviluppata tra la pressione applicata e la riduzione nella popolazione microbica ad una temperatura e tempo stabiliti. I metodi adottati per derivare questo parametro possono essere differenti, ma il risultato finale deve garantire unicamente l'efficace previsione di riduzioni batteri che per mezzo delle Alte Pressioni. Durante il processo il campione non è immediatamente sottoposto alla temperatura, tempo o pressione stabiliti. La pressione nella camera raggiunge il valore programmato dopo un certo periodo di tempo. La temperatura è un fattore strettamente dipendente da questo incremento nella pressione e che influenza il grado di trattamento ricevuto dal campione. Quando la pressione nella camera sale essa è accompagnata da un corrispondente incremento nella temperatura, noto come "riscaldamento adiabatico", che può esporre il campione a temperature più elevate di quelle originariamente previste durante il processo. In molte ricerche il riscaldamento adiabatico non è stato preso in considerazione, il che genera incertezza e complica la standardizzazione degli effetti del trattamento termico associato (Smelt,1998).

Tabella 1 (da Tewari et al.,1999)

Microrganismo	Pressione	Temperatura	Valore D	Reference
<i>Clostridium pasteurianum</i>	700	60	2.4	Maggi et al.(1995)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	800	60	3.4	Maggi et al.(1995)
<i>Citrobacter freundii</i>	230	20	14.7	Carlez et al.(1992)
<i>Listeria monocytogenes</i> ScottA	414	25	2.17	Ananth et al.(1998)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	414	2	1.48	Ananth et al.(1998)
<i>Listeria innocua</i> 91 O CECT	400	2	3.12	Gervilla et al.(1997)
<i>Listeria innocua</i> 91 O CECT	400	25	4	Gervilla et al.(1997)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27690	200	20	211.8	Erkmen e Karatas (1997)
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	20	15	Erkmen e

ATCC 27690				Karatas (1997)
Staphylococcus aureus ATCC 27690	300	20	3.7	Erkmen e Karatas (1997)
Staphylococcus aureus ATCC 27690	350	20	2.6	Erkmen e Karatas (1997)
Listeria innocua	400	2	7.35	Pance et al.(1998)
Listeria innocua	400	20	8.23	Pance et al.(1998)
*D-value è definito come il tempo richiesto per causare una riduzione decimale nella popolazione				
microbica a pressione e temperatura costanti.				

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è stato quello di testare il comportamento di *Listeria innocua* inoculata in campioni di carne trita di pollame sottoposti a trattamento ciclico con le Alte Pressioni Idrostatiche .

In primis però abbiamo applicato il trattamento di pressurizzazione continua e ciclica su campioni di Tryptic Soy Broth inoculati con *Listeria innocua*.

MATERIALI E METODI

Listeria innocua ATCC 33090 è stata ottenuta da pellets congelati in provette termosaldate dall'Istituto Pasteur, Parigi , Francia.

La carne trita di pollo è stata fornita da uno stabilimento riconosciuto CEE.

❖ Preparazione della sospensione batterica in soluzione di tryptic soy broth

Listeria innocua ATCC 33090 è stata reidratata con l'aggiunta di 0,3 mL di TSB (Tryptic Soy Broth, from Merck) seminata su piastra di TSA (Tryptic Soy Agar, from Difco) incubata a 37°C per 24 ore e stoccata a 4°C.

Prima dell'uso, il singolo pellet fu risospeso in 5 ml di TSB, e incubato a 37°C per 48 ore.

Successivamente, 3 ml di brodo fu inoculato in 100 ml di TSB incubato a 37°C per 48 ore in agitazione.

Furono necessarie per ottenere una concentrazione approssimativa di 10^7 - 10^8 CFU/mL prima del trattamento con le Alte Pressioni Idrostatiche ulteriori diluizioni in brodo.

Per verificare lo sviluppo microbico, fu eseguita la densità ottica a 600 nm mediante spettrofotometro.

La sospensione cellulare (25 ml di TSB) fu confezionata in sacchetti di polietilene (SR 150 x 300 PA/PE 20/70 Siegelrand-Beutel, France), sottoposti poi alle Alte Pressioni.



Preparazione della sospensione batterica in TSB



Sacchetti con sospensione di TSB



Spettrofotometro

❖ **Preparazione dei campioni di carne trita di pollo inoculati con *Listeria innocua***

1-ml di sospensione cellulare ottenuta da TSB fu aggiunta a 25 g di carne di pollo trita e agitata per 5 minuti.

I campioni furono saldati sottovuoto in sacchetti sterili di polietilene (PA/PE 20/70 μm) e sottoposti a trattamento con le alte pressioni. Ogni trattamento fu eseguito in doppio.



Sacchetto di carne trita di pollo inoculata

❖ **Procedura e parametri delle Alte Pressioni testate**

L'apparecchiatura usata per il trattamento con le alte pressioni è una pressa discontinua isostatica in uso presso – l'ENSCP (‘Ecole Nationale Supérieure de Chimie et de Physique’), University Bordeaux I: Sciences and Technologies, France.

L'apparecchiatura utilizzata raggiunge una pressione di 800 MPa. La pressione e la temperatura sono state monitorate durante tutto il processo. E' stata utilizzata acqua come fluido pressurizzante.

I campioni di *Listeria innocua* ATCC 33090 in sospensione di TSB furono sottoposte a trattamenti di pressione tra 150-550 MPa, a 4 e 20°C

per tempi differenti (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min e 5 min x 3 cicli, 3 min x 5 cicli, 2 min x 5 cicli, 5 min x 2 cicli, 2 min x 7 cicli).

I campioni di carne trita di pollo inoculati con *Listeria innocua* ATCC 33090 furono sottoposti a pressione di 200-350 MPa a 4°C per 5 min x 3 cicli.

Dopo il trattamento tutti i campioni sono stati stoccati a temperatura di refrigerazione fino alle analisi.

❖ Conta microbica dei campioni in tryptic soy broth

Diluizioni decimali furono allestite a partire dal tryptic soy broth. 0,1 ml di ogni diluizione fu seminata su Listeria Palcam selective agar base (Merk) in doppio. Le piastre furono incubate a 37°C per 24/48 h e il numero delle colonie fu riportato in log₁₀ CFU/ml.

❖ Campioni di carne trita di pollo inoculati con *Listeria innocua*

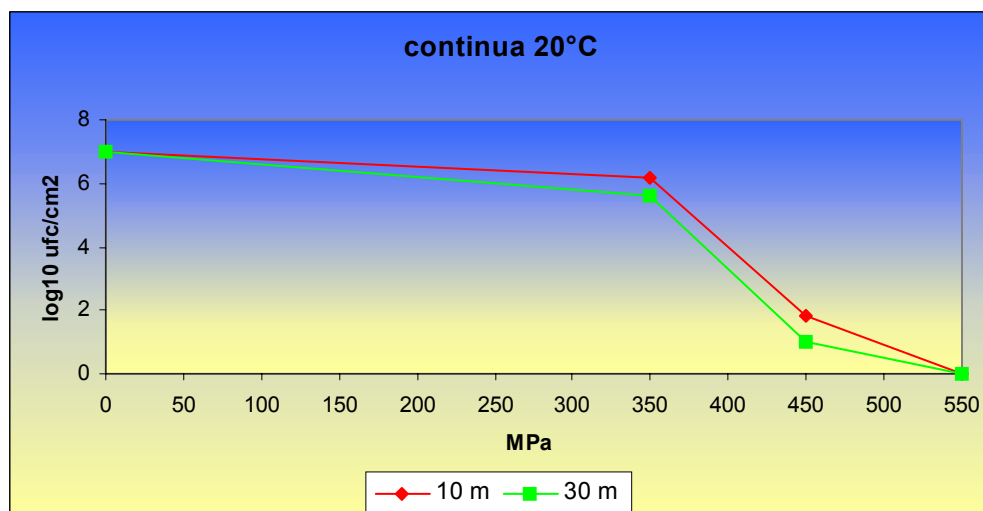
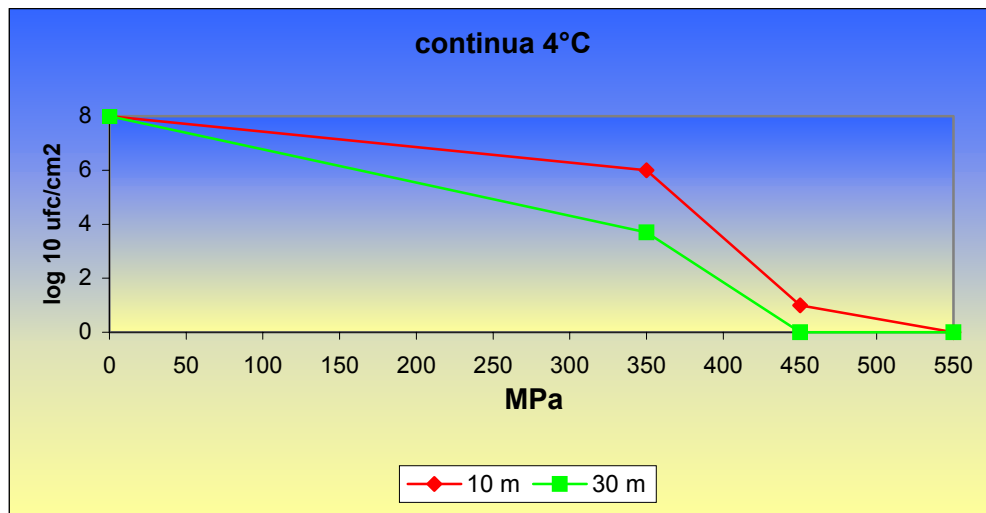
25 grammi di carne di pollo trita furono omogeneizzati in 225 ml of buffered peptone water mediante Stomacher®. Diluizioni decimali furono allestite in tubi sterili di buffered peptone water (AES Laboratoire) e 0.1 ml di ogni diluizione fu seminata in doppio sul terreno selettivo: Listeria Palcam selective agar base (Merck) per valutare la crescita di *Listeria innocua* ATCC 33090. Le piastre furono incubate a 37°C per 24-48 h e il numero delle colonie fu riportato in log₁₀ CFU/gr.

RISULTATI

❖ Effetto della pressurizzazione continua su *Listeria innocua* in tryptic soy broth

Nella fase iniziale della ricerca abbiamo valutato l'effetto delle alte pressioni su *Listeria innocua* ATCC 3090, inoculata in TSB, sia a 4°C sia a 20° a 350, 450 e 550 MPa per 10 e 30 minuti.

Tali studi furono utilizzati come punto di partenza per stabilire i livelli di pressione necessari per inattivare il patogeno.

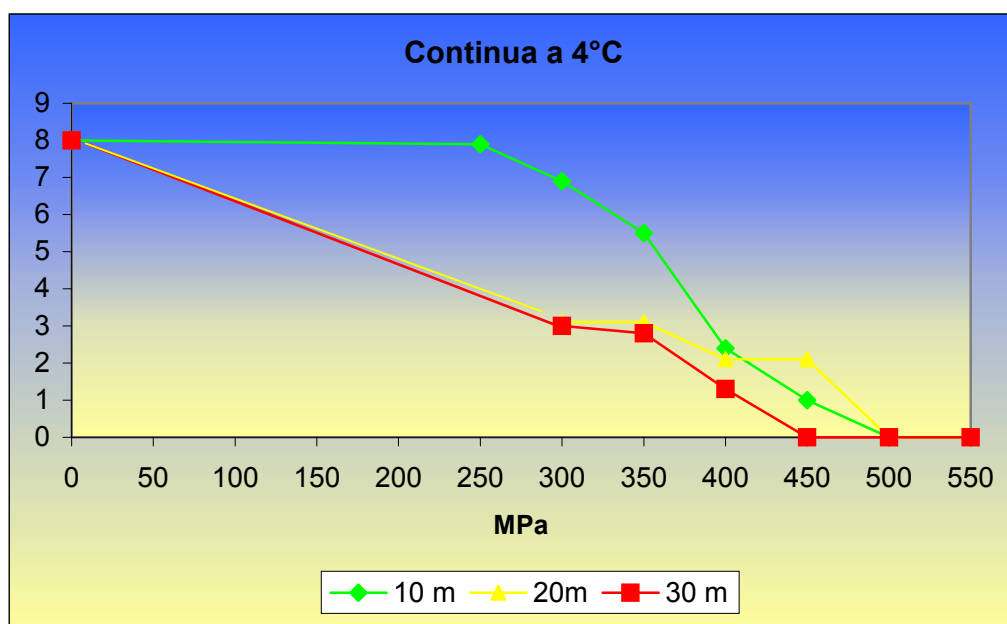


Come si evince dai grafici, la pressurizzazione continua a 4°C ha mostrato un'inattivazione della *Listeria innocua* maggiore rispetto a quella eseguita a 20°C. Nello specifico l'inattivazione completa con

il trattamento a 10 e 30 minuti a 4°C è stata osservata rispettivamente a 450 Mpa e 550 Mpa, mentre con il trattamento a 10 e 30 minuti a 20°C è stata osservata solo a 550 Mpa.

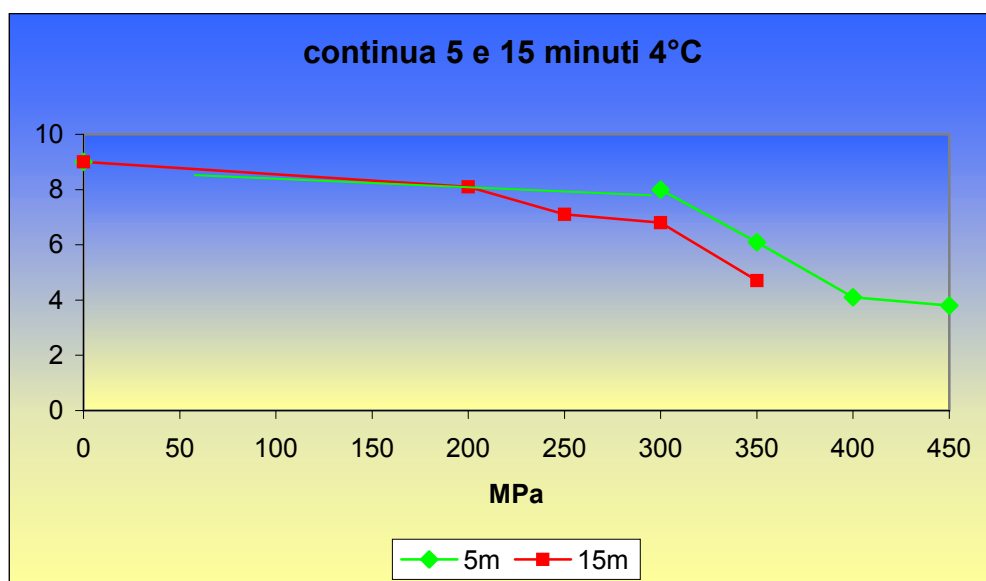
A partire da questi dati si è proceduto alla verifica di ulteriori parametri e di pressione e di tempo da 200 Mpa a 550 Mpa per 5, 10, 15, 20 e 30 minuti.

MPa	10 m	20m	30 m
0	8	8	7,9
250	7,9		
300	6,9	3,1	3
350	5,5	3,1	2,8
400	2,4	2,1	1,3
450	1	2,1	0
500	0	0	0
550	0	0	0



Partendo da una concentrazione iniziale di *Listeria innocua* in TSB di $10^8/\text{ml}$, sottoposta al trattamento a 10 e 20 minuti l'inattivazione del microrganismo è avvenuta a 500 MPa, mentre con il trattamento a 30 minuti l'inattivazione si è osservata a 450 MPa.

MPa	5m	15m
0	9	9
200		8,1
250		7,1
300	8	6,8
350	6,1	4,7
400	4,1	
450	3,8	

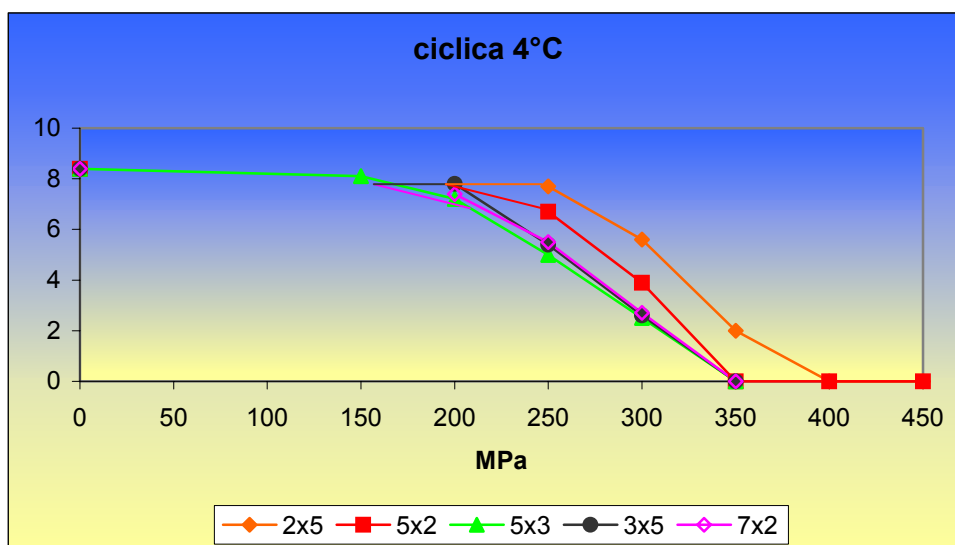


Da una concentrazione iniziale di *Listeria innocua* di 10^9 /ml in TSB si è osservata una riduzione di circa 5 log a 450 MPa per il trattamento a 5 minuti, mentre a 350 MPa si è osservata la riduzione di circa 5 log per il trattamento a 15 minuti.

Effetto dei trattamenti ciclici delle Alte pressioni su TSB

Cicli di pressurizzazione - depressurizzazione furono eseguiti in un ranges che andava da 150 a 450 Mpa a temperatura di 4°C.

MPa	2x5	5x2	5x3	3x5	7x2
0	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4
150			8,1		
200			7,2	7,8	7,4
250	7,7	6,7	5	5,4	5,5
300	5,6	3,9	2,5	2,6	2,7
350	2	0	0	0	0
400	0	0			
450	0	0			



Con il trattamento a 2 cicli di pressurizzazione per 5 minuti si è osservata l'inattivazione di *Listeria innocua* in TSB a 400 MPa, per tutti gli altri cicli l'inattivazione è avvenuta a 350 MPa.

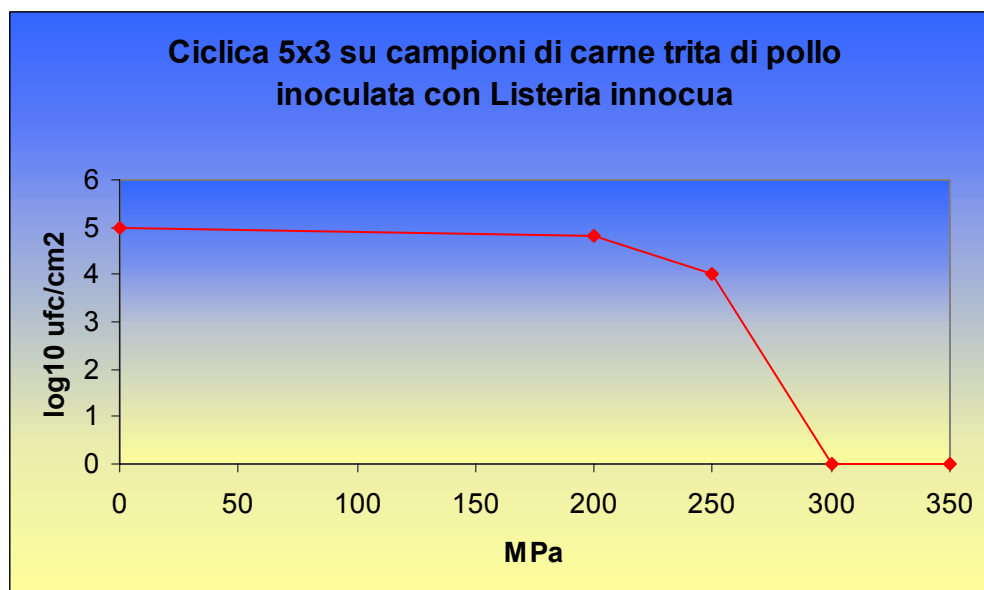
Si è notato inoltre che con 5 cicli di pressurizzazione per 3 minuti si è verificata una maggiore riduzione logaritmica di *Listeria innocua* rispetto agli altri trattamenti. Questa considerazione ci ha fatto propendere per il suo utilizzo negli studi su carne trita di pollo.

Effetto dei trattamenti ciclici delle Alte pressioni su carne trita di pollo

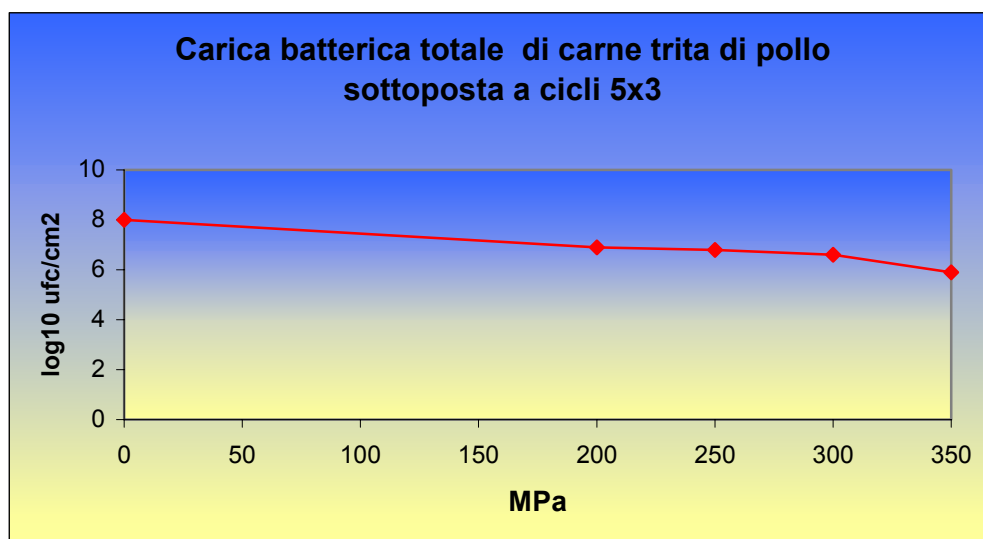
Sono state testate concentrazioni di inoculo di 10^5 ufc/g e 10^3 ufc/g di *Listeria innocua* in campioni di carne trite di pollo. La scelta delle concentrazioni più basse rispetto a quelle utilizzate nel TSB, è stata dettata dalla necessità di avvicinarsi al livello di contaminazione che potrebbe riscontrarsi nelle carni di pollame e in previsione di una futura applicazione del processo a livello industriale.

Contemporaneamente è stato valutato anche il comportamento della Carica Batterica Totale che nella prima sperimentazione era pari a 10^8 ufc/g e nella seconda sperimentazione uguale a $\log 10^6$ ufc/g .

Valori di <i>Listeria innocua</i> inoculata in carne trita di pollo	
MPa	5x3
0	5
200	4,8
250	4
300	0
350	0

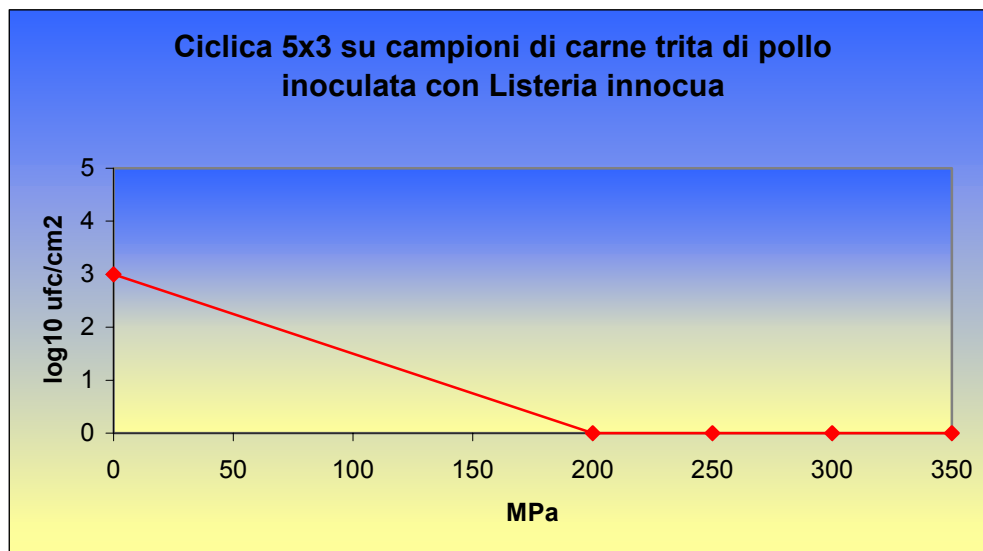


Valori della Carica Batterica Totale della carne trita di pollo	
MPa	5x3
0	8
200	6,9
250	6,8
300	6,6
350	5,9

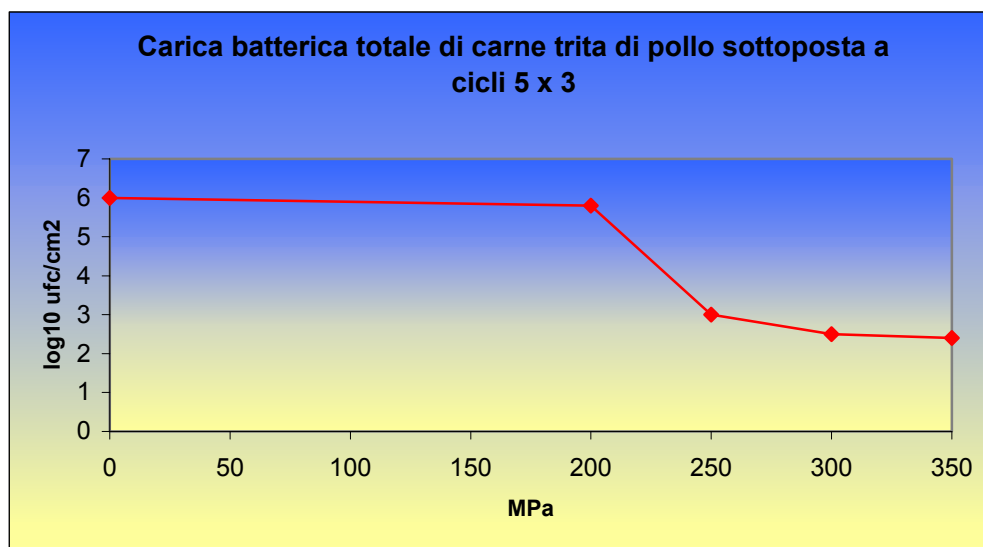


Nel primo esperimento l'inattivazione della *Listeria innocua* è stata osservata a 300 MPa, la carica batterica totale a 350 MPa ha mostrato una riduzione di 2,1 log.

Valori di <i>Listeria innocua</i> inoculata in carne trita di pollo	
MPa	5x3
0	3
200	0
250	0
300	0
350	0



Valori della Carica Batterica Totale della carne trita di pollo	
MPa	5x3
0	6
200	5,8
250	3
300	2,5
350	2,4



Nella seconda sperimentazione l'inattivazione della *Listeria innocua* si è manifestata a 200 MPa e la carica batterica totale ha presentato una riduzione di 3,6 log a 350 MPa.

Valutazione dell'aspetto della carne trita di pollo sottoposta alle alte pressioni

I campioni sottoposti al trattamento con le alte pressioni, rispetto al campione di controllo , hanno mostrato un colore più sbiadito e consistenza leggermente diminuita.



Carne trita di pollo dopo trattamento a 200, 250,300 e 350 MPa

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nel Tryptic Soy Broth l'inattivazione di *Listeria innocua* a 4°C nel trattamento pressorio continuo si è osservata a 450 Mpa e a 550 Mpa rispettivamente per 10 e 30 minuti.

Questo ci ha permesso di testare sempre in campioni di TSB inoculati con *Listeria innocua*, i cicli di pressurizzazione e depressurizzazione da utilizzare per individuare i più efficaci.

Si è constatato dunque che 5 cicli per 3 minuti a 350 MPa a 4°C permettevano l'inattivazione completa del patogeno.

In base ai risultati di questi studi preliminari è stata definita l'applicazione ciclica delle alte pressioni su campioni di carne trita di pollo inoculati con *Listeria innocua*.

I dati relativi a quanto sopra ci permettono di affermare che i trattamenti ciclici da noi individuati aumentano gli effetti sulla inattivazione di *Listeria innocua* e nel contempo la riduzione dei livelli pressori ha permesso anche di preservare abbastanza l'aspetto delle carni trite.

Concludendo possiamo affermare che, le alte pressioni rappresentano una interessante procedura per la stabilizzazione microbica delle carni al fine di eliminare batteri patogeni e di ridurre i deterioranti potenzialmente presenti nell'alimento.

BIBLIOGRAFIA

- **Marino M., Maifreni M., Comi G., Soncini G.,-** Qualità microbiologica di carni avicole commercializzate in Italia- Ingegneria Alimentare 2/95;
- **Barbuti S., Ghini M., Campanini M.,-** Industria Conserviera, 64, 221-224, 1990;
- **Cantoni C., Valentini M.,-** Industria Alimentare XXIX, dicembre , 1109-1110, 1990;
- **Comi G., d'Aubert S., Valenti M.,-** Industria Alimentare XXIX, 358-361, 1990;
- **Galli R., Sannipoli C.G.T., Valente C.,-** Industria Alimentare XXXI, gennaio, 21-27, 1992;
- **Ianieri A., Francioso E., Tiecco G.,** Industria Alimentare XXIX, novembre, 998-1003, 1990;
- **Pearson A.M., Dutson T.R., -** Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products. - 1994.
- **Baylis P.A., Hinton M.H.-** *Transportation and mortality of broilers.* Appl. Alim. Behav. Sci., 28,93-118. (1990).
- **Grattan D.A.P.** *Causes of trauma in broilers.* Vet. Rec 132,2,48(1993).
- **Gregory N.G.** *Pathology and handling of poultry at the slaughterhouse.* World's Poult. Sci.J., 50,1,66-67. (1994).
- **Gregory N.G., Austin S.V.** *Causes of trauma in broilers arriving dead at poultry processing plants.* Vet. Rec 131,21,501-503(1992).

- **Swarbrick O.** *The Welfare during transport of broilers, old hens and replacement pullets.* In *The Welfare of animals in transit*, Ed. Gibson T.E.Br.Vet.Ass.Anim. Welfare-Fund., London, 82-97. (1986).
- **Moni A., Chiozzi R.** *Protezione degli animali durante il trasporto.* *Progresso Veterinario* 2/99.
- **Ferrarini S., Mulinelli F.,** *Atlante di patologia ispettiva degli avicoli.* Calderini Ed agricole.
- **Documenti del Comitato Bioetica Per la Veterinaria- presso l'Ordine dei Medici Veterinari della provincia di Roma.** *La tutela degli animali durante il trasporto.* -Edizioni Medico Scientifiche .
- **Cinotti F., Peccolo G.,** *Protezione animale .* UTET
- **Knowles, T.G. , Broom D.M** *The handling and transport of broilers and spent hens.* *Applied Animal Behavioural Science* 28, 75-91.(1990)
- **Warris P.D. , Beavis E.A. , Brown S.N. Edwards J.E.** *Longer journeys to processing plants are associated with higher mortality in broilers chickens.* *British Poultry Science* 33, 201-206(1992)
- **Capita R.,Prieto M., Carlos A.C.,-** *Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses-* *Journal of Food Protection* (2004)- vol 67 n°6 pag 1303-1308
- **Anderson M.E.H.E. Huff, H.D.Naumann, R.T.Marshall, J.Daimare, R. Johnson, M. Pratt-** *Evaluation of swab and tissue excision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses.-* *Journal of Food Protection* (1987)- vol 50 pag 741-743.

- **Arnald J.W.**-Development of bacterial biofilm during poultry processing. –Poultry Avian Biology. Rev.9:1-9., 1998;
- **Bacon R.T., J.N.Sofos, K.E.Belk ., G.C.Smith**- Application of a commercial steam vacuum unit to reduce inoculated Salmonella on chilled fresh beef adipose tissue- Dairy Food Environ. Sanit. 22:184-190., 2002;
- **Benito Y., C.Pin, M.L.Marini, M.L.García, M.D.Selgas, C. Casas.**- Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces.- Meat Science : 45:419-425 .1997;
- **Bolton D.J.**- The Decision of the 8th June 2001 (EC/471/2001): excision versus swabbing .Food Control 14:207-209, 2003;
- **Cabedo L., J.N. Sofos, G.C.Smith**- Removal of bacteria from beef tissue by spray washing after different times of exposure to fecal material. J. Food Prot. 59:1284-1287, 1996.
- **Chung K.T., J.S.Dickson, J.D.Crouse.**- Attachment and proliferation of bacteria on meat.- J.Food Protec. 52: 173-177.
- **Decisione della Commissione dell'8 giugno 2001**- Norme per i controlli regolari delle condizioni igieniche generali, svolti dagli operatori negli stabilimenti conformemente alla Dir. 64/433/CEE sulle condizioni sanitarie per la produzione e l'immissione sul mercato di carni fresche e alla Dir. 71/118/CEE relativa a problemi sanitari in materia di scambi di carni fresche di volatili da cortile;
- **Dorsa W.J., C.N.Cutter, G.R. Siragusa**-Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. – Lett. Appl. Microbiol. 22:39-41, 1996;

- **Emswiler B.S., J. E. Nichols, A.W. Kotula, D.K. Rough-** Device for microbiological sampling of meat surfaces.- J.Food Prot. 41:546-548, 1978;
- **Fliss I., R.E. Simard, A.Ettriki.-** Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. - J.Food Prot. 56:249-251., 1991;
- **Gill C.O., T. Jones-** Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing.- J. Food Prot. 62: 167-173, 2000;
- **Huffman R.D.-** Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. Meat Science 62:285-294, 2002;
- **Izat A.L., M. Colberg, C.D.Driggers, R.A.Thomas-** Effects of sampling method and feed withdrawal period on recovery of microorganisms from poultry carcasses .-J. Food Prot, 52:480-483, 1989;
- **Jorgenesen F., R. Bailey, S.Williams, P.Henderson, D.R.A. Wareing, F.J . Bolton, J.A. Frost, L.Ward, T.J. Humphrey-** Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp on raw, whole chickens in relation to sampling methods- Int. J. Food Microbio 76:151-164, 2002;
- **Alpas H.,Kalchayanand N.,Bozoglu F.,Sikes A.,Dunne C.P.,Ray B.,** -Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens-. Applied and Environmental Microbiology, 65(9):4248-4251, 1999.
- **Alpas H. et al.,**-Interaction of high hydrostatic pressure, pressurization and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens- Int.J.Food Microb.,60,33-42,2000.

- **Balny C.&Masson P.,** -“Effects of High Pressure on proteins-. Food Rev.Int.,9:611-628, 1993.
- **Basset J. et Macheboeuf M.A.,** « Etudes sur les effets biologiques des ultra pressions : Résistance des bactéries, des diastases et des toxines aux pressions très élevées ». Comptes Rendus Académie des Sciences 195, p1431.
- **Carlez A.,Rosech J.P.,Richard N.,Cheftel J.C.,**”High Pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle”.Lebensm.Wiss.Technol.,26,357. 1993
- **Cheftel J.C.,** “Review: High Pressure, microbial inactivation and food preservation” Food Sci.Technol.Intern.,1:75-90. 1995.
- **Eicher R., Merkulow N.,Van Almsick G., Ludwig H.,**“High Pressure inactivation Kinetics of moulds”. High Pressure Biology and Medicine, St.Petersburg 7-9 July, Russia. 1997
- **Hoover D.G., Metrick C.,Papineau A.M.,Farkas D.F.,Knorr D.,** “Biological effects of High Hydrostatic Pressure on food micro-organisms”.Food Technology (March) :99-106. 1989;
- **Jorgensen L.V.,Huss H.H.,** “Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood”. International Journal of Food Microbiology, 42(1/2):127-131. 1998
- **Knorr D.,** “Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology”. New Methods of food preservation (ed.G.W.Gould),pp.159-175. 1995.
- **Patterson M.F.,Kilpatrick D.J.,** “The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry”. Journal of Food Protection, 61(4):432-436. 1998.

- **Simpson R.K.& Gilmour A.**, “The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate buffered saline and model food systems”. J.Appl.Microbiol.,83:181-188. 1997.
- **Yuste J.,Pla R.,Mor-Mur M.**, “*Salmonella enteritidis* and aerobic mesophiles in inoculated poultry sausages manufactured with high-pressure processing”. Letters in Applied Microbiology, 31(5):374-377. 2000.
- **Balny C., Masson P., Heremans K.**, “High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes”. Biochimica et Biophysica Acta,1595:3-10. 2002.
- **Commission Decision of 1 March 2005 that indicate a control official programs of foods to 2005 in CE and in U.S.A in october 2004 -** “USDA FSIS Compliance Guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products”.
- **United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection service Washington, DC (2005)** “ Safe and Suitable ingredients used in the production of meat and poultry products”.
- **Picart L., E. Dumay, J.P. Guiraud and J. C. Cheftel-** “Inactivation de *Listeria Innocua*, *Micrococcus Luteus* et *Pseudomonas Fluorescens* dans du sumon fume par traitements combines haute pressione-basse temperature” – 16° rencontre Agroal Nantes 2004- ppg 56-62 .

- **Sencer Buzrul, Hami Alpas** – “ Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua* : a preliminary study- FEMS Microbiology Letters – 2004, 238, pag 29- 36 .
- **Yuste J., R. Pla, M.Capellas, M. Mor-Mur,** - “Application of high pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination” – Food Control – 2002, 13, pag 451- 455.
- **Yuste J.,Pla R., Beltram R., Mor Mur M** - “High pressure processing at subzero temperature : Effect on spoilage microbiota of poultry” - High Pressure Research – 2002, 22, pag 673- 676.
- **Kimon A. G. Karatzas and Marjon H.J. Bennik-** “ Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with High Tolerance towards High Hydrostatic Pressure”- Applied and Environmental microbiology , 2002, July, pag 3183- 3189.
- **Ritz M., J. L. Tholozan, M. Federghi , M. F. Pilet.** - “ Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure”- International Journal of Food Microbiology- 79, 2002 pag 47-53 .
- **Ritz M., J. L. Tholozan, M. Federghi , M. F. Pilet.** - “Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure”- Applied and Environmental Microbiology – may 2001 pag 2240- 2247 .
- **U.S.Food and Drug Administration Center for food Safety and Applied Nutrition** - “Kinetics of Microbial inactivation for alternative food processing technologies- Overarching Principles: Kinetics and pathogens of concern for all technologies “ June 2, 2000.

- **Tholozan J.L, M. Ritz, F. Jugiau, M. Federighi, J.P. Tissier** - “Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*”- *Journal of Applied Microbiology* 88- 2000, pag 202-212.
- **Ritz M., F. Jugiau, F. Rama, P. Courcoux, M. Semnou, M. Federighi** – “ Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interaction of treatment variables studied by analysis of variance”- *Food Microbiology* – 2000 , 17, pag 375-382.
- **Yuste J., M. Mor-Mur, M.Capellas, R. Pla** - “*Listeria innocua* and aerobic mesophile during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure” – *Meat Science*- 1999, 53, pag 251-257.
- **Yuste J., M. Mor-Mur, M.Capellas, B. Guamis and R. Pla** - Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin”.- *Food Microbiology* –1998, 15, pag 407-414.
- **Simpson R.K., A. Gilmour** - “ The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods” – *Food Microbiology* – 1997, 14, pag 567- 573.
- **Judy K. O’Brien and Robert T. Marshall** - “Microbiological quality of raw round chicken processed at high isostatic pressure”- *Journal of Food Protection* (1995)- vol 59 n°2 pag 146-150.
- **Carlez A., J. P.Rocse, N. Richarda and J.C.Cheftell** – “High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle” – *Lebensm .Wiss. Technology* – 1993, 26, pag 357-363.